PCT

世界知的所有権機関 際 事 務 局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6

C12N 15/12, C07K 14/705, C12P 21/02, C07K 16/28

(11) 国際公開番号

WO99/46378

(43) 国際公開日

1999年9月16日(16.09.99)

(21) 国際出願番号

PCT/JP99/01191

A1

(22) 国際出願日

1999年3月11日(11.03.99)

(30) 優先権データ

特願平10/60245 特願平11/26774 1998年3月12日(12.03.98)

1999年2月3日(03.02.99)

JP

(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 山之内製薬株式会社

(YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 Tokyo, (JP)

(72) 発明者;および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ)

松本光之(MATSUMOTO, Mitsuyuki)[JP/JP]

杉本 貫(SUGIMOTO, Toru)[JP/JP]

高崎 淳(TAKASAKI, Jun)[JP/JP]

蒲原正純(KAMOHARA, Masazumi)[JP/JP]

斉藤 哲(SAITO, Tetsu)[JP/JP]

〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21

山之内製薬株式会社内 Ibaraki, (JP)

小林正人(KOBAYASHI, Masato)[JP/JP]

〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目17番1号

山之内製薬株式会社内 Tokyo, (JP)

(74) 代理人

弁理士 長井省三,外(NAGAI, Shozo et al.)

〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目17番1号

山之内製薬株式会社 特許部内 Tokyo, (JP)

(81) 指定国 AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユー ラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)

添付公開書類

国際調査報告書

(54) Title: **NOVEL G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEINS**

(54)発明の名称 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質

(57) Abstract

Regarding the field of genetic engineering, novel G protein-coupled receptor family proteins SREB1, SREB2 and SREB3 expressed in the central nervous system; genes encoding these proteins; and a screening method, etc., with the use of these proteins. An example f methods for acquiring such a G protein-coupled receptor protein as described above comprises effecting RT-PCR with the use of mRNA extracted from a human or rat brain tissue or cells originating in the brain as a template by employing two primers between which the whole translational region of the G protein-coupled receptor protein or a part thereof is sandwiched to thereby obtain cDNA of the G proteincoupled receptor protein or a part thereof and then integrating the cDNA into an appropriate vector followed by the expression thereof in host cells.

(57)要約

本発明は遺伝子工学の分野に属し、中枢神経系に発現している新規なG蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質SREB1、SREB2およびSREB3、該蛋白質をコードする遺伝子、並びに、該蛋白質を用いたスクリーニング法等を提供する。

本発明G蛋白質共役型レセプター蛋白質の取得方法の一つとして、ヒトまたはラット脳組織あるいは脳由来細胞から抽出されたmRNAを鋳型として、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質翻訳領域の全体または一部をはさむ2種類のプライマーを用い、RTーPCRを行うことにより、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNAまたはその一とにより、該G蛋白質共役型レセプターに組み込み、宿主細胞で発現させる方法が挙げられる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)
AE アラブ音及国連邦
AL アルバニア
AN アルバニア
AN アルバニア
AT オーストリア
AT オーストリア
AC アゼルバイジャン
BA ボスニア・スクシーグ・スクシーグ・スクシーグ・スクシーグ・スクシーグ・スクシーグ・スクシーグ・スクシーグ・スクシーグ・スクシーグ・スクシーグ・スクシーグ・スクシーグ・スクシーグ・スクシーグ・スクランド
BA バルバドス
BB バルバドス
BB バルバドス
BB バルバドス
BB バルボドス
BB バルボドス
BC アブルギナ・ファソ
BC アブルギナ・ファソ
BC アブルギナ・ファソ
BC アブルギナン
BR アブルギナン
BR アブルギナン
BR アブルギナン
BR アブルギナン
BR アブルギナン
BR アブルガー
CA カナダ
CA カナルー
CA カナダ
CA カナルー
CA カナダ
CA カナルー
CA カナダ
CA

1

明細書

新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質

技術分野

本発明は、遺伝子工学の分野に属し、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする遺伝子、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を用いたスクリーニング法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体、該抗体を用いたスクリーニング法に関するものである。

背景技術

三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達する細胞膜レセプター群は「G蛋白質共役型レセプター」と総称されている。現在まで知られている全ての G蛋白質共役型レセプターはアミノ末端を細胞外、カルボキシル末端を細胞内とし、細胞膜を 7 回貫通する構造を共有するスーパーファミリーを形成していることから「7 回膜貫通型レセプター」と総称される場合もある。 G蛋白質共役型レセプターは様々な生理活性物質の情報を、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化、それにより引き起こされる細胞内セカンドメッセンジャーの変動を介して細胞膜から細胞内へと伝達する。三量体型 GTP 結合蛋白質により制御される細胞内セカンドメッセンジャーは、アデニレートシクラーゼを介する cAMP、フォスフォリパーゼ C を介する Ca**などがよく知られているが、三量体型 GTP 結合蛋白質を介したチャネルの制御、リン酸化酵素の活性化など多くの細胞蛋白がその標的となっていることが最近明らかとなってきた(Gudermann, T. et al. (1997) Annu. Rev. Neurosci., 20, 399-427)。 G蛋白質共役型レセプターを介して情報を伝達する生理活性物質の中には、神経伝達物質、ホルモン、ケモカイン、脂質由来の情報伝達物質、2 価イオ

ン、プロテアーゼなど既存の生理活性物質の多くが含まれる。これら生理活性物質には それぞれ特異的なG蛋白質共役型レセプターが存在し、その情報を細胞内に伝達する。

現在までに数百種類のG蛋白質共役型レセプターが真核生物からクローニングされている。ヒトに関しては百種類以上の内在性リガンドとの対応がとれたG蛋白質共役型レセプターがクローニングされており、これらが疾患に対する薬剤の標的となっている。G蛋白質共役型レセプターが標的となっている疾患は多岐にわたり、中枢神経系、循環器系、炎症免疫系、消化器系、運動器系、泌尿器生殖器系それぞれの分野でG蛋白質共役型レセプターに作用する有効な薬剤が存在する(Stadel, J. et al. (1997) Trends Pharmacol. Sci., 18, 430-437)。このことはG蛋白質共役型レセプターのアゴニスト或いはアンタゴニストが疾患の治療剤となる可能性が高いことを示唆し、そのため新たなG蛋白質共役型レセプターの発見、同定のための研究が盛んに行われている。

G蛋白質共役型レセプターはそのスーパーファミリー内での構造類似性から遺伝子のクローニングが先行する場合も多く、内在性リガンドとの対応がとれていないレセプターはオーファンG蛋白質共役型レセプターと呼ばれている。一般的にオーファンG蛋白質共役型レセプターは特異的なリガンドが発見されていないため、そのアゴニスト、アンタゴニストを開発することは困難であった。しかし、近年、充実された化合物ライブラリーと高性能ハイスループットスクリーニングを組み合わせることで、オーファンG蛋白質共役型レセプターをターゲットとした薬剤の創製が提唱されている(Stadel, J. et al. (1997) Trends Pharmacol. Sci., 18, 430-437)。

すなわち、多くのG蛋白質共役型レセプターのセカンドメッセンジャーとなっている cAMP、 Ca⁺⁺の測定、或いは、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化の指標となる GTPase 活性、 GTP 7S のG蛋白質結合測定をハイスループット化することで化合物ライブラリーからオーファンG蛋白質共役型レセプターに対するアゴニストをスクリーニングすることが可能であり、その化合物を利用した特異的なアゴニスト及びアンタゴニストの発見、ひいては特定の疾患治療薬の開発が可能であるということである。このような状況下では、新しい疾患

の治療ターゲットとなり得る新規G蛋白質共役型レセプターの発見が、G蛋白質共役型レセプターに作用する薬剤創製の最も重要なステップと見なすことができる。

G蛋白質共役型レセプターでは、一つの内在性リガンドに対して複数のレセプターが存在する場合がある。このようなレセプター群はレセプターファミリーとよばれ、各々のレセプターはサブタイプと称される。全てのG蛋白質共役型レセプターは細胞膜を7回貫通する構造を共有するため、互いに独立したG蛋白質共役型レセプターでも膜貫通領域を中心に20-25%のアミノ酸が保存されているが、レセプターファミリーを形成している場合にはそのサブタイプ間で保存されているアミノ酸の割合が35%以上、特に関連が高いサブタイプ間では60-80%と有意に上昇する(Strader, C.D. et al. (1994) Annu. Rev. Biochem., 63, 101-132)。

レセプターファミリーが存在する内在性リガンドをターゲットとした疾患治療薬の開発を考える際には、サブタイプの特異性が重要となる場合が多い。通常、薬剤の主作用を介するサブタイプへの作用に対して、他のサブタイプへの作用は副作用につながることが多いためである。このためサブタイプ特異的なアゴニスト、或いはアンタゴニストの創製が望まれるが、そのためにはサブタイプの特異性を検出する手段が必要である。現在ではサブタイプの遺伝子をクローニングし、それを発現させた培養細胞系などを用いて特異性を検出する系を構築するという方法が一般的である。

新規なG蛋白質共役型レセプターを疾患治療のターゲットとする場合にもサブタイプ特異性が重要である可能性は高く、このため新規G蛋白質共役型レセプターにおいてもレセプターファミリーの発見は重要である。独立したG蛋白質共役型レセプター間ではアミノ酸配列のホモロジーは全体で20-25%であるが、レセプターファミリーを形成している場合、ファミリー内では通常ホモロジーが有意に上昇することから、二者のG蛋白質共役型レセプターのホモロジーを比較することで、それらがファミリーを形成しているかどうか推定することが可能である。これを利用することでファミリーを形成している新規G蛋白質共役型レセプターの発見も可能であり、新規G蛋白質共役型レセプターファミリーが発見された場

-4

合は、サブタイプ特異的なアゴニスト及びアンタゴニストの創製が可能なことから疾患治療薬への道が更に拓けるものと考えられる。

中枢神経系は神経伝達物質に代表される生理活性物質を用いて様々な情報を伝達、制御している。その情報伝達および制御にG蛋白質共役型レセプターが重要な役割を果たしている。多くの種類のG蛋白質共役型レセプターが中枢神経系に存在しているため、それらは中枢神経系の疾患の重要な治療ターゲットとなっている。例えば、神経伝達物質ドーパミンのG蛋白質共役型レセプターは精神分裂病(Seeman, P. et al. (1997) Neuropsychopharmacology, 16, 93-110)、セロトニンのG蛋白質共役型レセプターは鬱病(Cowen, P. J. (1991) Br. J. Psychiatry, 159 (Suppl. 12), 7-14)、ニューロペプチド Y のG蛋白質共役型レセプターは摂食障害(Blomqvist, A. G. and Herzog, H. (1997) Trends Neurosci., 20, 294-298)の治療ターゲットであると考えられている。

中枢神経系で発現している新規なG蛋白質共役型レセプター、好ましくはヒト由来のレセプターは新たな中枢神経系の疾患の治療ターゲットの候補または中枢神経系の機能解明に繋がると考えられる。また、サブタイプ特異的な薬剤を開発するためには中枢神経系で発現している新規なG蛋白質共役型レセプターにおいてもファミリーを発見することが望ましい。本発明G蛋白質共役型レセプターの一つ SREB1 のアミノ酸配列に対してホモロジーが高いマウスから得られたレセプター GPR27 の遺伝子と、その遺伝子配列に基づくアミノ酸配列が報告されている(O' Dowd, B.F. et al. (1998) Genomics, 47, 310–313)が、ヒト由来のレセプターの遺伝子配列、アミノ酸配列は現時点では知られていない。

発明の開示

本発明は、中枢神経系に発現している新規G蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質を中枢性疾患の治療薬剤の標的として提供することを課題とする。

the second second second

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、中枢神経系に発現している新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質ファミリーをコードする遺伝子(SREB1、SREB2、SREB3、rSREB1、rSREB3、rSREB3)を単離することに成功した。

また、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該宿主細胞を用いた同G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造法を確立、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質及 び該G蛋白質共役型レセプター蛋白質活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスク リーニングを可能とした。

具体的には本発明は、

(1) 配列番号:2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列を有しているG蛋白質共役型レセプター蛋白質、あるいは、該蛋白質の同効物であるG蛋白質共役型レセプター蛋白質、

好ましくは配列番号: 2、4または6記載のアミノ酸配列を有しているヒト由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは該蛋白質の同効物であるG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは6、22または26記載のアミノ酸配列を有しているラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは該蛋白質の同効物であるG蛋白質共役型レセプター蛋白質であり、

- (2) 配列番号: 2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列を有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、
- (3) 前記(1)に記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子、
 - (4) 前記(3)記載の遺伝子を含むベクター、
 - (5) 前記(4)記載のベクターを含む宿主細胞、
- (6) 前記(5)記載の宿主細胞を用いる前記(1)または(2)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、あるいは、該蛋白質の同効物であるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法、

- (7) 前記(1)または(2)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質と被験化合物とを接触させ、当該G蛋白質共役型レセプター蛋白質作用薬をスクリーニングする方法、または
- (8) 前記(1)または(2)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドに対する抗体に関する。

以下、本発明で使用される用語につき説明する。

「ヒト由来」または「ラット由来」とは、ヒトまたはラットで発現しているG蛋白質共役型レセプター蛋白質のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列であることをいう。

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の「同効物」とは、配列番号: 2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列で示されるG蛋白質共役型レセプター蛋白質のいずれかと同一の活性を示す、中枢神経系に発現しているG蛋白質共役型レセプター蛋白質をいう。

なお、G蛋白質共役型レセプターとG蛋白質共役型レセプター蛋白質は、同義である。

本発明の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質は、配列番号: 2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列で示されるG蛋白質共役型レセプター蛋白質、あるいは、それらの同効物なら何れでもよい。具体的には配列番号: 2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列において1もしくは複数個、好ましくは1乃至10個、更に好ましくは1乃至7個、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸でアミノ酸の置換、欠失または挿入があるアミノ酸配列を有し、かつ、配列番号: 2、4、または6記載のアミノ酸配列で示される蛋白質と同一の活性を有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質であれば本発明に包含される。好ましくは、ヒト由来又はラット由来の配列番号: 2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列を有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質である。

また、本発明の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有する 遺伝子は、配列番号: 2、4、または6記載のアミノ酸配列で示されるG蛋白質共役型レセ プター蛋白質、あるいは、それらの同効物をコードする塩基配列を有する遺伝子なら何れ でもよい。好ましくは、配列番号: 2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子である。さらに好ましくは、配列番号: 1記載の塩基配列の1番目から1125番目、配列番号: 3記載の塩基配列の1番目から1110番目、配列番号: 5記載の塩基配列の1番目から1119番目、配列番号: 21記載の塩基配列の1番か目ら1131番目、配列番号: 23記載の塩基配列の1番目から1110番目、又は配列番号: 25記載の1番目から1119番目を有する遺伝子である。

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする遺伝子は、以下の方法によって得ることができる。

1)新規G蛋白質共役型レセプター遺伝子の製造方法

a)第1製造法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を産生する能力を有するヒト細胞あるいは 組織から mRNA を抽出する。次いでこの mRNA を鋳型として該G蛋白質共役型レセプター蛋白質 mRNA または一部の mRNA 領域をはさんだ2種類のプライマーを作製する。 denature 温度、変性剤添加条件などを改良し、SREB1、SREB2、または SREB3 のそれぞれに適した逆転写酵素ーポリメラーゼ連鎖反応(以下 RT-PCR という)を行うことにより、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質 cDNA またはその一部を得ることができる。さらに、得られたG蛋白質共役型レセプターcDNA またはその一部を適当な発現ベクターに組み込むことにより、宿主細胞で発現させ、該レセプター蛋白質を製造することができる。

まず、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の産生能力を有する細胞あるいは組織、例えばヒト脳またはラット脳から該蛋白質をコードするものを包含する mRNA を既知の方法により抽出する。抽出法としては、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネートーグアニジン・塩酸法等が挙げられるが、好ましくはグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法が挙げられる。該蛋白質の産生能力を有する細胞あるいは組織は、該蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子あるいはその一部を用いたノーザン ブロッティング法、該蛋白質に特異的な抗体を用いたウエスタン ブロッティング法などにより特定することができる。

mRNA の精製は常法に従えばよく、例えば mRNA をオリゴ(dT)セルロースカラムに吸着・溶出させ、精製することができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等により mRNA をさらに分画することもできる。 また、mRNA を抽出せずとも、市販されている抽出済 mRNA を用いても良い。

次に、精製された mRNA をランダムプライマー又はオリゴdTプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い第1鎖cDNAを合成する。この合成は常法によって行うことができる。 得られた第1鎖cDNAを用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ2種類のプライマーを用いて PCR に供し、目的とする新規G蛋白質共役型レセプターDNA を増幅する。得られた DNAをアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、上記 DNAを制限酸素等で切断し、接続することによって目的とする DNA 断片を得ることもできる。

b)第2製造法

本発明の遺伝子は上述の製造法の他、常法の遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。まず、前述の方法で得た mRNA を鋳型として逆転写酵素を用いて1本鎖 cDNA を合成した後、この1本鎖 cDNA から2本鎖 cDNA を合成する。その方法としてはS 1ヌクレアーゼ法(Efstratiadis, A. et al. (1976) Cell, 7, 279-288)、Land 法(Land, H. et al. (1981) Nucleic Acids Res., 9, 2251-2266)、O. Joon Yoo 法(Yoo, O. J. et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1049-1053)、Okayama-Berg 法(Okayama, H. and Berg, P. (1982) Mol. Cell. Biol., 2, 161-170)などが挙げられる。

次に、上述の方法で得られる組換えプラスミドを大腸菌、例えば DH5 α株に導入して形質転換させて、テトラサイクリン耐性あるいはアンピシリン耐性を指標として組換体を選択することができる。宿主細胞の形質転換は、例えば、宿主細胞が大腸菌の場合にはHanahan の方法(Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol., 166, 557–580)、すなわち CaCl, や MgCl, または RbCl を共存させて調製したコンピテント細胞に該組換え DNA 体を加える方法により実施することができる。なお、ベクターとしてはプラスミド以外にもラムダ系などのファージベクターも用いることができる。

上記により得られる形質転換株から、目的の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の DNA を有する株を選択する方法としては、例えば以下に示す各種方法を採用できる。

① 合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の全部または一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し(この場合コドン使用頻度を用いて導いたヌクレオチド配列または考えられるヌクレオチド配列を組合せた複数個のヌクレオチド配列のどちらでもよく、また後者の場合、イノシンを含ませてその種類を減らすこともできる)、これをプローブ(32P又は33Pで標識する)として、形質転換株の DNA を変性固定したニトロセルロースフィルターとハイブリダイズさせ、得られたポジティブ株を検索して、これを選択する。

② ポリメラーゼ連鎖反応により作製したプローブを用いるスクリーニング法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の一部に対応するセンスプライマーとアンチセンスプライマーのオリゴヌクレオチドを合成し、これらを組合せてポリメラーゼ連鎖反応(Saiki, R. K. et al. (1988) Science 239, 487-491)を行い、目的のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の全部又は一部をコードする DNA 断片を増幅する。ここで用いる鋳型 DNA としては、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を産生する細胞の mRNA より逆転写反応にて合成した cDNA、またはゲノム DNA を用いることができる。このようにして調製した DNA を断片を 32P 又は 33P で標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーションまたはプラークハイブリダイゼーションを行うことにより目的のクローンを選択する。

③ 他の動物細胞で新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質を産生させてスクリーニング する方法

形質転換株を培養し、遺伝子を増幅させ、その遺伝子を動物細胞にトランスフェクトし (この場合、自己複製可能で転写プロモーター領域を含むプラスミドもしくは動物細胞の 染色体に組み込まれ得るようなプラスミドのいずれでもよい)、遺伝子にコードされた蛋白 を細胞表面に産生させる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体を用 いて該蛋白質を検出することにより、元の形質転換株より目的のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする cDNA を有する株を選択する。

- ④ 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体を用いて選択する方法 あらかじめ、cDNA を発現ベクターに組込み、形質転換株表面で蛋白を産生させ、本発 明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体および該抗体に対する2次抗体を用 いて、所望のG蛋白質共役型レセプター蛋白質産生株を検出し、目的の株を選択する。
 - ⑤ セレクティブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーションの系を用いる方法

形質転換株から得られる cDNA を、ニトロセルロースフィルター等にブロットし本発明の G蛋白質共役型レセプター蛋白質産生細胞からの mRNA をハイブリダイズさせた後、 cDNA に結合した mRNA を解離させ、回収する。回収された mRNA を蛋白翻訳系、例えば アフリカツメガエルの卵母細胞への注入や、ウサギ網状赤血球ライゼートや小麦胚芽等 の無細胞系で蛋白に翻訳させる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体を用いて検出して、目的の株を選択する。

得られた目的の形質転換株より本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする DNA を採取する方法は、公知の方法(Maniatis, T. et al.(1982): Molecular Cloning—A Laboratory Manual "Cold Spring Harbor Laboratory, NY)に従い実施できる。例えば細胞よりプラスミド DNA に相当する画分を分離し、該プラスミド DNA より cDNA 領域を切り出すことにより行ない得る。

c)第3製造法

配列番号: 2、4、6、22、または26で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子は、化学合成法によって製造した DNA 断片を結合することによっても製造できる。各 DNA は、DNA 合成機(例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer(Beckman 社)、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems 社)など)を用いて合成することができる。

d)第4製造法

本発明の遺伝子を利用して遺伝子工学的手法により得られる物質が本発明のG蛋白 質共役型レセプター蛋白質機能を発現するためには、必ずしも配列表 配列番号:2、4、 6、22、または26に示されるアミノ酸配列のすべてを有するものである必要は無く、例え ばその一部の配列であっても、あるいは他のアミノ酸配列が付加されていても、それが配 列番号:2、4、6、22、または26に示されるアミノ酸配列で示されるG蛋白質共役型レセ プター蛋白質と同一の活性を示す限り、それらの蛋白質もまた本発明のG蛋白質共役型 レセプター蛋白質に包含される。また、一般に真核生物の遺伝子はインターフェロン遺伝 子等で知られているように、多型現象(polymorphism)を示すと考えられ(例えば、Nishi, T. et al. (1985) J. Biochem., 97, 153-159 を参照)、この多型現象によって1または複数個の アミノ酸が置換される場合もあれば、ヌクレオチド配列の変化はあってもアミノ酸は全く変 わらない場合もある。したがって、配列番号:2、4、または6で示されるアミノ酸配列の中 の1もしくは複数個の部位において、1もしくは複数個のアミノ酸残基が置換、失欠、また は挿入されている蛋白質でも配列番号:2、4、または6記載のアミノ酸配列で示されるG 蛋白質共役型レセプターと同一の活性を有していることがありえる。これらの蛋白質は、 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の同効物と呼び、本発明に含まれる。また、 配列番号: 22、24、または26で示されるラット由来アミノ酸配列を有するG蛋白共役型レ セプター、または当該レセプターと同一の活性を有しているG蛋白共役型レセプターも同 効物に包含される。

これらの本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の同効物をコードする塩基配列を有する遺伝子はすべて本発明に含まれる。このような各種の本発明の遺伝子は、上記本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の情報に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法(Hunkapiller, M. et al.(1984) Nature, 10, 105-111)等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる(Crantham, R. et al.(1981) Nucleic Acids Res.,9 r43-r74)。さらに、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用したサイトスペシフィック・ミュータジェネシス(site specific

mutagenesis)(Mark, D. F. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666)等に従うことができる。

以上、a)乃至d)により得られる DNA の配列決定は、例えばマキサムーギルバートの化学修飾法(Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1980): Methods in Enzymology "65, 499-559)やM13を用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法(Messing, J. and Vieira, J (1982) Gene, 19, 269-276)等により行うことができる。

また、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質は、下記の方法によって得ることができる。

2)本発明のG蛋白質共役型レセプターの組み換え蛋白質の製造方法

単離された本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする遺伝子を含む断片は、適当なベクターDNA に再び組込むことにより、他の真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。

真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えばサルの細胞である COS 細胞(Gluzman, Y. (1981) Cell, 23, 175-182)やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO)のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株(Urlaub, G. and Chasin, L. A.(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220)、ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞および同細胞に Epstein Barr Virus の EBNA-1 遺伝子を導入した 293-EBNA 細胞 (Invitrogen 社)等がよく用いられているが、これらに限定されるわけではない。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr (Subramani, S. et al. (1981) Mol. Cell. Biol., 1,854-864)、ヒトの elongation factor プロモーターを有する pEF-BOS

(Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322)、cytomegalovirus プロモーターを有する pCEP4(Invitrogen 社) 等を例示できるが、これに限定されない。

宿主細胞として、COS 細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40 複製起点を有し、COS 細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよび RNA スプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S、(Maruyama, K. and Takebe,Y. (1990) Med. Immunol., 20, 27-32)、pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322)、pCDM8(Seed, B. (1987) Nature, 329, 840-842) 等が挙げられる。該発現ベクターは DEAEーデキストラン法 (Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308)、リン酸カルシウムーDNA 共沈殿法(Graham, F. L. and van der Ed, A. J. (1973) Virology, 52, 456-457)、FuGENE6(Boeringer Mannheim 社)を用いた方法、および電気パスル穿孔法(Neumann, E. et al.(1982) EMBO J., 1, 841-845)等により COS 細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。

また、宿主細胞として CHO 細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418 耐性マーカーとして機能する neo 遺伝子を発現し得るベクター、例えば pRSVneo(Sambrook, J. et al. (1989): "Molecular Cloning-A Laboratory Manual "Cold Spring Harbor Laboratory, NY)や pSV2-neo(Southern, P. J. and Berg,P. (1982) J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341)等をコ・トランスフェクトし、G418 耐性のコロニーを選択することにより新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質を安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞として293-EBNA 細胞を用いる場合には、Epstein Barr Virus の複製起点を有し、293-EBNA 細胞で自己増殖が可能な pCEP4(Invitrogen 社)などの発現ベクターを用いて所望の形質転換細胞を得ることができる。

上記で得られる所望の形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内または細胞表面に本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記 COS 細胞であれば RPMI-1640 培地やダルベッコ修正イーグル

最小必須培地(DMEM)等の培地に必要に応じ牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したものを使用できる。また、上記 293-EBNA 細胞であれば牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に G418 を加えたものを使用できる。

上記により、形質転換体の細胞内または細胞表面に生産される本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質は、該レセプター蛋白質の物理的性質や化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法により、それらより分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えばレセプター蛋白質を含む膜分画を可溶化した後、通常の蛋白沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー(ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、変析法、これらの組合せ等を例示できる。なお、膜分画は常法に従って得ることができる。例えば本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を表面に発現した細胞を培養し、これらをバッファーに懸濁後、ホモジナイズし遠心分離することにより得られる。また、できるだけ緩和な可溶化剤(CHAPS、Triton X-100、ジキトニン等)でG蛋白質共役型レセプター蛋白質を可溶化することにより、可溶化後もレセプターの特性を保持することができる。

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質はマーカー配列とインフレームで融合して発現させることで、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現の確認、細胞内局在の確認、精製等が可能になる。マーカー配列としては、例えば、FLAG epitope、Hexa-Histidine tag、Hemagglutinin tag、myc epitope などがある。また、マーカー配列と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の間にエンテロキナーゼ、ファクターXa、トロンビンなどのプロテアーゼが認識する特異的な配列を挿入することにより、マーカー配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去する事が可能である。例えば、ムスカリンアセチルコリン受容体と Hexa-Histidine tag とをトロンビン認識配列で連結した報告がある(Hayashi, M.K. and Haga, T. (1996) J. Biochem., 120, 1232–1238)

本発明にはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスクリーニング法が包含される。該スクリーニング法は、前記により構築されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質を用いて、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の生理学的な特性に応じたG蛋白質共役型レセプター蛋白質の修飾の指標を測定する系に被験薬を添加し、該指標を測定する手段を含む。該測定系は、具体的には、以下のスクリーニング方法が挙げられる。また、被験薬は従来G蛋白質共役型レセプターリガンド活性を有することは知られているが該新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性に対して選択的に修飾するか不明な化合物またはペプチド、あるいはケミカルファイルに登録されている種々のG蛋白質共役型レセプターリガンド活性については不明の公知化合物やペプチド、コンビナトリアル・ケミストリー技術(Terrett, N.K., et al. (1995) Tetrahedron, 51, 8135-8137)によって得られた化合物群やファージ・ディスプレイ法(Felici, F., et al. (1991) J. M.I. Biol., 222, 301-310)などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物などもスクリーニングの対象となる。あるいは本発明のスクリーニング法により選択された化合物またはペプチドを化学的または生物学的に修飾した化合物またはペプチドを用いうる。

- 3)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質にリガンド、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスクリーニング方法
- a)リガンド結合アッセイ法を利用したスクリーニング方法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合する化合物、ペプチド及び抗体(総称してリガンド)はリガンド結合アッセイ法によりスクリーニングする事ができる。該レセプター蛋白質を発現させた細胞膜、あるいは該レセプター蛋白質精製標品を調製し、リガンド結合アッセイ用に精製されたリガンドを放射性標識(50-2000 Ci/mmol)する。緩衝液、イオン、pHのようなアッセイ条件を最適化し、最適化したバッファー中で同レセプター蛋白質を発現させた細胞膜、あるいは該レセプター蛋白質精製標品を放射性標識したリガンドと共に一定時間インキュベーションする。反応後、ガラスフィルター等で濾過し適量のバッフ

アーで洗浄した後、フィルターに残存する放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する(全結合量)。放射性標識していないリガンドを上記反応液中に大過剰加えることにより非特異的結合量を測定し、全結合量から非特異的結合量を差し引くことにより特異的結合量がえられる。該レセプター蛋白質を発現させた細胞膜、あるいは該レセプター蛋白質精製標品に対して特異的結合を示したリガンドを本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドとして選択することができる。また、得られた放射活性リガンドの結合阻害を指標に該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体、アンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体、アンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体、アンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体、アンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。

b) GTP rS 結合法を利用したスクリーニング方法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体はGTP γ S結合法によりスクリーニングすることが可能である(Lazareno, S. and Birdsall, N.J.M. (1993) Br. J. Pharmacol. 109, 1120–1127)。該レセプター蛋白質を発現させた細胞膜を 20 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM GDP 溶液中で、35S で標識された GTP γ S 400 pM と混合する。被検薬存在下と非存在下でインキュベーション後、ガラスフィルター等で濾過し、結合した GTP γ S の放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。被検薬存在下における特異的な GTP γ S 結合の上昇を指標に、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。また、得られたアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体による GTP γ S 結合上昇の抑制を指標に該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体による GTP γ S 結合上昇の抑制を指標に該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体による GTP γ S 結合上昇の抑制を指標に該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。

c)細胞内 Ca⁺⁺および cAMP 濃度の変動を利用したスクリーニング方法

进行的现在分词的

多くのG蛋白質共役型レセプター蛋白質はアゴニスト刺激で細胞内の Ca⁺の上昇および/またはcAMP 濃度の上昇または低下を引き起こす。ゆえに本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体は細胞内 Ca⁺またはcAMP 濃度の変動を利用してスクリーニングすることが可能である。Ca⁺濃度の測定はfura2 等を用い、cAMP 濃度の測定は市販の cAMP 測定キット(Amersham 社等)を用いて測定する。

また、Ca*および cAMP 濃度に依存して転写量が調節される遺伝子の転写活性を検出することにより間接的に Ca*および cAMP 濃度を測定することが可能である。該レセプター蛋白質を発現させた細胞とレセプター蛋白質を発現させていない宿主細胞(コントロール細胞)に化合物、ペプチド、組織抽出物等を一定時間作用させ、Ca*および cAMP 濃度を直接あるいは間接的に測定する。コントロール細胞と比較して、該レセプター蛋白質を発現させた細胞特異的な Ca*の上昇および/または cAMP 濃度の上昇または低下を指標にアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。また、得られたアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体による Ca*の上昇および/または cAMP 濃度の上昇または低下を指標に該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。

d)マイクロフィジオメーターを用いたスクリーニング方法

細胞が様々なシグナル応答を行う場合、細胞外への微少な水素イオンの流出が検出される。この水素イオンの流出は、その大部分が、細胞が応答するためのエネルギーを得るための燃料消費で生ずる代謝産物の増加、または細胞のシグナルが直接水素イオンポンプに伝達する場合に生ずる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質は、そのシグナル伝達にエネルギーを必要とするため、レセプターの活性化の際には水素イオンの流出が起こる。CYTOSENSORマイクロフィジオメーター(Molecular Devices 社)により、こ

のような細胞近傍の培地中の微少な水素イオンの流出による pH 変化が検出可能であることから、このようなエネルギーを消費する受容体の活性化の検出に利用できる。

該レセプター蛋白質を発現させた細胞とレセプター蛋白質を発現させていない宿主細胞(コントロール細胞)に化合物、ペプチド、組織抽出物等を一定時間作用させ、水素イオンの流出による pH 変化を測定する。コントロール細胞と比較して、該レセプター蛋白質を発現させた細胞特異的な水素イオンの流出による pH 変化を指標にアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。また、得られたアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体による水素イオンの流出による pH 変化を指標に該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体による水素イオンの流出による pH 変化を指標に該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。

本発明には、G蛋白質共役型レセプター蛋白質または前記スクリーニング法により選択されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を有意に修飾する化合物、ペプチド及び抗体を有効成分とする医薬が包含される。

本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質に反応する抗体、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、は各種動物に該新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質や該 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の断片を直接投与することで得ることができる。また、本発明 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする遺伝子を導入したプラスミドを用いて DNA ワクチン法(Raz, E. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9519-9523; Donnelly, J. J. et al. (1996) J. Infect. Dis., 173, 314-320) によっても得ることができる。

ポリクローナル抗体は該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁し、腹腔、皮下また静脈等に免疫して感作した動物、例えばウサギ、ラット、ヤギ、またはニワトリ等の血清または卵から製造される。このように製造された血清または卵からポリクローナル抗体は常法の蛋白質単離精製法により分離精製することができる。そのような方法としては例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、プロティンAアガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられる。

以上のように分離精製された抗体につき、常法により、ペプシン、パパイン等の蛋白質分解酵素によって消化を行い、引き続き常法の蛋白質単離精製法により分離精製することで、活性のある抗体の一部分を含む抗体断片、例えば、F(ab')2、Fab、Fab'、Fv を得ることができる。

モノクローナル抗体は、ケーラーとミルスタインの細胞融合法(Kohler, G. and Milstein, C. (1975) Nature, 256, 495-497)により当業者が容易に製造することが可能である。

本発明 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁した乳濁液を数週間おきにマウスの腹腔、皮下または静脈に数回繰り返し接種することにより免疫する。最終免疫後、脾臓細胞を取り出し、ミエローマ細胞とと融合してハイブリドーマを作製する。

ハイブリドーマを得るためのミエローマ細胞としては、ヒポキサンチンーグアニンーホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損やチミジンキナーゼ欠損のようなマーカーを持つミエローマ細胞、例えば、マウスミエローマ細胞株 P3X63Ag8.U1、を利用する。また、融合剤としてはポリエチレングリーコールを利用する。さらにはハイブリドーマ作製における培地として、イーグル氏最小必須培地、ダルベッコ氏変法最小必須培地、RPMI-1640 などの通常よく用いられているものに適宜 10~30%の牛胎児血清を加えて用いる。融合株は HAT 選択法により選択する。ハイブリドーマのスクリーニングは培養上清を用い、ELISA 法、免疫組織染色法などの周知の方法または前記のスクリーニング法により行い、目的の抗体を分泌しているハイブリドーマのクローンを選択する。また、限界希釈法によって、サブクローニングを繰り返すことによりハイブリドーマの単クローン性を保証する。このようにして得られるハイブリドーマは培地中で 2~4日間、あるいはプリスタンで前処理した BALB/c系マウスの腹腔内で 10~20 日培養することで精製可能な量の抗体が産生される。

このように製造されたモノクローナル抗体は培養上清あるいは腹水から常法の蛋白質 単離精製法により分離精製することができる。そのような方法としては例えば、遠心分離、 透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、プロテ インAアガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられる。また、モノクローナル抗体ま たはその一部分を含む抗体断片は該抗体をコードする遺伝子の全部または一部を発現ベクターに組み込み、大腸菌、酵母、または動物細胞に導入して生産させることもできる。以上のように分離精製された抗体につき、常法により、ペプシン、パパイン等の蛋白質分解酵素によって消化を行い、引き続き常法の蛋白質単離精製法により分離精製することで、活性のある抗体の一部分を含む抗体断片、例えば、F(ab')2、Fab、Fab'、Fv を得ることができる。

さらには、本発明 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質に反応する抗体を、クラクソンらやゼベデらの方法(Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352, 624-628; Zebedee, S. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3175-3179)により single chain Fv や Fab として得ることも可能である。また、マウスの抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子に置き換えたトランスジェニックマウス(Lonberg, N. et al. (1994) Nature, 368, 856-859) に免疫することでヒト抗体を得ることも可能である。

本発明医薬は、G蛋白質共役型レセプターの活性を選択的に制御する新規な薬理作用を有することを特徴としており、該医薬の用途としては該G蛋白質共役型レセプター活性の亢進、低下、変性等の異常に起因するあるいは該異常を発現・併発する疾患である中枢性疾患などが挙げられる。

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質活性修飾化合物、ペプチド、抗体または抗体断片を有効成分とする製剤は、該有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製されうる。

投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、経口用液剤などによる経口投与、あるいは静注、筋注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、経粘膜投与剤などによる非経口投与が挙げられる。特に胃で消化されるペプチドにあっては静注等の非経口投与が望まれる。

本発明による経口投与のための固体組成物は、一つ又はそれ以上の活性物質が少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグ

ネシウムなどと混合される。組成物は常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤などを含有していてもよい。錠剤や丸剤は必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆していてもよい。

経口のための液体組成物は、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。該組成物は不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

非経口のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を含む。水溶性の溶液剤や懸濁剤には、希釈剤として例えば注射用蒸留水、生理用食塩水などが含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としてはプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80等を含む。該組成物はさらに湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤、防腐剤などを含んでいてもよい。組成物は例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、または照射によって無菌化される。また、無菌の固体組成物を製造し、使用に際し無菌水その他の無菌用注射用媒体に溶解し使用することもできる。

投与量は前記スクリーニング法により選択された有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、性別等を考慮して適宜決定される。

図面の簡単な説明

図1は、SREB1、SREB2、及び SREB3 のアミノ酸配列のアラインメントを示す。

図2は、SREB1のヒト臓器についてのノーザン解析の結果を示す。

図3は、SREB1のヒト脳の各領域についてのノーザン解析の結果を示す。

図4は、SREB2のヒト臓器についてのノーザン解析の結果を示す。

図5は、SREB2のヒト脳の各領域についてのノーザン解析の結果を示す。

図6は、SREB3のヒト臓器についてのノーザン解析の結果を示す。

図7は、SREB3のヒト脳の各領域についてのノーザン解析の結果を示す。

図8は、SREB1、SREB2 または SREB3 蛋白質の発現を確認した結果を示す。

図9は、抗3LO抗体の SREB1、SREB2 または SREB3 に対する結合活性を示す。

図10は、抗C24抗体の SREB1 に対する結合活性を示す。

図11は、SREB1、SREB2 または SREB3 を導入した細胞における pCRE-Luc 由来のルシフェラーゼ活性を示す。

図12は、SREB1、SREB2 または SREB3 を導入した細胞における pSRE-Luc 由来のルシフェラーゼ活性を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を更に具体的に開示するために、実施例を記載するが、本発明は実施例に限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法(Maniatis, T. at al. (1982): "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY)に従って実施可能である。

(実施例1)新規G蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質をコードする遺伝子の単離本発明のG蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質(SREB1、SREB2 または SREB3)をコードする全長 cDNA は、ヒト脳由来の poly A+ RNA(Clontech 社)を template として RT-PCR により取得した。

新規G蛋白質共役型レセプターヒト SREB1 の増幅には forward primer として 5'-AAAATCTAGA CGCGATGGCGAACGCGAGCGA-3'(配列番号: 7)、reverse primer として 5'-AAAATCTAGA GTCTATGTGGCGGGGCCTCCC-3'(配列番号: 8)を用いた(それぞれの 5'末端には Xbal site が付加してある)。RT-PCR は Pfu DNA polymerase(Stratagen 社)を用い 5% formamide 存在下で 98 ℃(20 秒) / 64 ℃(30 秒) / 74 ℃(3 分) のサイクルを 34 回繰り返した。その結果、約 1.2 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を Xbalで消化した後、pCEP4 plasmid(Invitrogen 社)を用いてクローニングした。pCEP4 plasmid

は、動物細胞において強力なプロモーター活性を示す CMV プロモーターを持っているので、動物細胞に組み換え蛋白質を発現させるのに使用できる。得られたクローンの塩基配列は dideoxy terminator 法により ABI377 DNA Sequencer(Applied Biosystems 社)を用いて解析した。明らかになった配列を配列表配列表配列番号: 1に示す。

同配列は 1125 base の open reading frame(配列番号: 1の第 1 番目から第 1125 番目)を持っている。open reading frame から予測されるアミノ酸配列(375 アミノ酸)を配列表配列番号: 2に示す。予想アミノ酸配列は、G蛋白質共役型レセプターの特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子がG蛋白質共役型レセプターをコードすることが解った。

新規G蛋白質共役型レセプターヒト SREB2 の増幅には forward primer として 5'-AAAATCTAGA TCTATGGCGAACTATAGCCATGCA-3'(配列番号:9)、reverse primer として 5'-AAAATCTAGA AAGGCTAAAGATTTACAGATGCTCC-3'(配列番号:10)を用いた(それぞれの 5'末端には Xbal site が付加してある)。RT-PCR は Pfu DNA polymeras (Stratagene 社)を用い 96°C(20 秒) / 54°C(30 秒) / 74°C(3 分) のサイクルを 34 回繰り返した。その結果、約 1.2 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を Xbal で消化した後、pCEP4 plasmid(Invitrogen 社)を用いてクローニングした。 得られたクローンの塩基配列は dideoxy terminator 法により ABI377 DNA Sequencer(Applied Biosystems 社)を用いて解析した。明らかになった配列を配列表 配列番号:3 に示す。

同配列は 1110 base の open reading frame(配列番号:3の第1番目から第1110番目)を持っている。open reading frame から予測されるアミノ酸配列(370 アミノ酸)を配列表配列番号:4 に示す。予想アミノ酸配列は、G蛋白質共役型レセプターの特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子がG蛋白質共役型レセプターをコードすることが解った。

新規G蛋白質共役型レセプターヒト SREB3 の増幅には forward primer として 5'-AAAATCTAGA GTATGGCCAACACTACCGGAGAG-3'(配列番号: 11)、reverse primer として5'-AAAATCTAGA CCTGTCTGCCTACCAGCCTGC-3'(配列番号: 12)を用いた(そ

れぞれの 5'末端には Xbal site が付加してある)。RT-PCR は Pfu DNA polymerase (Stratagene 社)を用い 5% formamide 存在下で 98℃(20 秒) / 62℃(30 秒) / 74℃(3 分) のサイクルを 34 回繰り返した。その結果、約 1.2 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を Xbal で消化した後、pCEP4 plasmid(Invitrogen 社)を用いてクローニングした。 得られたクローンの塩基配列は dideoxy terminator 法により ABI377 DNA Sequencer(Applied Biosystems 社)を用いて解析した。明らかになった配列を配列表 配列番号:5 に示す。

同配列は 1119 base の open reading frame(配列番号:5の第1番目から第1119番目)を持っている。open reading frame から予測されるアミノ酸配列(373 アミノ酸)を配列表 配列番号:6 に示す。予想アミノ酸配列は、G蛋白質共役型レセプターの特徴である7個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子がG蛋白質共役型レセプターをコードすることが解った。

新規G蛋白質共役型レセプターSREB ファミリー(SREB1、SREB2 または SREB3)と既存のG蛋白質共役型レセプターファミリーとのホモロジーはそれぞれアミノ酸配列で25%以下である。

一方、SREB1 と SREB2 のホモロジーは 52%、SREB1 と SREB3 のホモロジーは 52%、SREB2 と SREB3 のホモロジーは 63%と既存のG蛋白質共役型レセプターとのホモロジーに比べ有意に高い(図1)。このことは本発明のG蛋白質共役型レセプターSREB1、SREB2 または SREB3 が既存のG蛋白質共役型レセプターとは独立した新規なG蛋白質共役型レセプターファミリーを形成していることを示している。

(実施例2)組織におけるヒト新規G蛋白質共役型レセプターファミリー遺伝子の発現分布 Northern blot hybridization 法により本発明のG蛋白質共役型レセプター遺伝子の発現分布を解析した。ヒト SREB1 の probe には cDNA 断片(配列番号:1の第722番目から第1054番目)を用いた。ヒトの各臓器由来の poly A+ RNA(2 μg)をブロットしたメンブレン (Clontech 社)と prob の hybridization は 50% formamide、5 x SSPE、10 x Denhardt's 溶

液、2% SDS、100 μg/ml 変性サケ精子 DNA を含む溶液中で、42°C(18 時間)で行った。メンブレンは、最終的に 0.2 x SSC、0.1% SDS を含む溶液で2回(65°C、30分)洗浄した。ヒトの各臓器(心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸、末梢血白血球)について Northern 解析を行ったところ、図2に示すように 3 kb の mRNA が脳、卵巣、精巣、心臓、前立腺で、3 kb と 2.3 kb の mRNA が末梢血白血球で検出された。また、膵臓でも 3 kb のシグナルが若干検出された。さらに、ヒト脳の各領域(扁桃体、尾状核、脳梁、海馬、黒質、視床下核、視床、小脳、大脳皮質、延髄、脊髄、大脳皮質後頭葉、大脳皮質前頭葉、大脳皮質側頭葉、被設)についても Northern解析を行った。本発明のG蛋白質共役型レセプターヒト SREB1 遺伝子の 3 kb の mRNAは調べた全てのヒト脳領域で検出され、ヒト脳内で広範に発現していることがわかった(図3)。

ヒト SREB2 の probe には cDNA 断片(配列番号:3 の第 558 番目から第 888 番目)を用いた。上記同条件でNorthern 解析を行ったところ、図4に示すように3.2 kb の mRNA が脳で、2.4 kb、3.5 kb、6.3 kb の mRNA が精巣で検出された。また、3.5 kb のシグナルが胎盤、脾臓で、3.2 kb のシグナルが小腸で若干検出された。本発明のG蛋白質共役型レセプターヒト SREB2 遺伝子の3.2 kb の mRNA は脳の中でも扁桃体、尾状核、海馬、黒質、視床下核、視床、小脳、大脳皮質群、被殻で多く検出され、脳梁、延髄、脊髄ではあまり検出されなかった。また、脳各領域で7.8 kb のシグナルが若干検出された(図5)。

と SREB3 の probe には cDNA 断片(配列番号:5 の第 1 番目から第 652 番目)を用いた。上記同条件で Northern 解析を行ったところ、図6に示すように 4 kb、5.1 kb の mRNA が脳で、4 kb、5.1 kb、9.7 kb の mRNA が卵巣で検出された。本発明のG蛋白質共役型レセプターヒト SREB3 遺伝子の mRNA は脳の各領域で 4 kb をメインに 5.1 kb、若干 9.7 kb のシグナルとして検出され、4 kb の mRNA は扁桃体、海馬、視床下核、小脳、大脳皮質で、5.1 kb の mRNA は黒質、視床下核、脊髄で比較的多く検出された(図7)。

以上の結果より、本発明のG蛋白質共役型レセプターファミリー遺伝子 SREB1、SREB2 または SREB3 は中枢神経系、泌尿器生殖器系を中心に発現していることが示された。

(実施例3)ヒト新規G蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質の発現の確認

ヒト SREB1、SREB2 または SREB3 を発現させるための発現ベクターとして pCEP4 (Invitrogen 社)を用いた。そのとき、ヒト SREB1、SREB2 または SREB3 の N 末端にマーカー配列として FLAG epitope を融合するために、SREB1、SREB2 または SREB3 の蛋白質コーディング配列の 5 末端に ATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGGGGATCCTG(配列番号: 13)を挿入した。このように構築したプラスミドはそれぞれ、pCEP4-FL-SREB1、pCEP4-FL-SREB2、pCEP4-FL-SREB3 とした。これらのプラスミドを用いることで、ヒトSREB1、SREB2 または SREB3 のポリペプチドの N 末端に Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Gly lle Leu(配列番号14)が融合したポリペプチドが発現する。

10cm シャーレに 293-EBNA(Invitrogen 社)を 1x10[®]細胞で播種して1日培養後、8 μg の pCEP4-FL-SREB1、pCEP4-FL-SREB2、pCEP4-FL-SREB3 および pCEP4-FL(ベクターのみ)を FuGENE6(Boeringer Mannheim 社)を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入後、一日培養した細胞を回収、洗浄後、20 mM Tris.HCl(pH7.4)/150 mM NaCl/コンプリート ™ (Boeringer Mannheim 社)に懸濁してポリトロンにてホモジェナイズした。ホモジェネートに最終濃度 0.2%、0.1%、0.2%になるように Triton X-100、Digitonin、sodium cholate を加え、4 ℃で2時間インキュベーションし、可溶化した。可溶化サンブルから M2-agarose(Sigma社)を用いて FLAG epitope 融合蛋白を免疫沈降した。免疫沈降物を 200 μM FLAG peptide/20 mM Tris-HCl(pH7.4)/150 mM NaCl で溶出した。溶出サンブルは濃縮後、SDS/10%~20% アクリルアミドゲル(第一化学薬品社)を用いて電気泳動後、ブロッティング装置を用いて PVDF 膜に転写した。転写後の PVDF 膜に、ブロッキング後、マウス抗FLAG モノクローナル抗体(M2; Sigma社)、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス lgG ポリクローナル抗体(Zymed社)を順次反応させた。反応後、ECL ウエスタンブロッティング検出システム(アマシャムファルマシア社製)を用いて SREB1、SREB2 またはSREB3 蛋白質の発現を確認した(図8)。

抗 FLAG 抗体と反応する蛋白質は pCEP4-FL を導入した細胞には存在しないが、pCEP4-FL-SREB1、pCEP4-FL-SREB2、pCEP4-FL-SREB3 を導入した細胞では、35-45 kDa のパンドとして検出された。ヒト SREB1、ヒト SREB2、またはヒト SREB3 の推定分子量はそれぞれ、39.8 kDa、42.0 kDa、41.5 kDa であり、ほぼ予測される分子量にパンドが存在した。また、ヒト SREB1 では二量体と考えられる 65-75 kDa のパンドも検出された。

(実施例4)ラット SREB1(rSREB1)、ラット SREB2(rSREB2)、またはラット SREB3(rSREB3)蛋白質をコードする遺伝子の単離

rSREB1、rSREB2、又は rSREB3 をコードする全長 cDNA は、ラット脳由来の poly A+RNA(Clontech 社)を template として RT-PCR により取得した。

rSREB1 の 増 幅 に は forward primer と し て 5'-AAAATCTAGACGCGATGGCGAACGCTAGTGA-3'(配列番号: 15)、reverse primerとして 5'-AAAATCTAGA CACTTTGAGAGTCTTGTGAAGGC-3'(配列番号: 16)を用いた(それぞれの 5'末端には Xbal site が付加してある)。cDNA の増幅、クローニング、塩基配列決定は実施例1と同様の方法で行った。明らかになった配列を配列表 配列番号: 21に示す。

同配列は1131 base の open reading frame (配列番号: 21の第1番目から第1131番目) を持っている。 open reading frame から予測されるアミノ酸配列(377 アミノ酸)を配列表配列番号: 22に示す。予想アミノ酸配列はヒト SREB1 と 97%一致していることから、本遺伝子が rSREB1 をコードすることが解った。

rSREB2 の 増 幅 に は forward primer と し て 5'-AAAATCTAGATCTATGGCGAACTATAGCCATGC-3'(配列番号: 17)、reverse primer として 5'-AAAATCTAGA AAGGCTAAAGATTTACAGATGCTCC-3'(配列番号: 18)を用いた(それぞれの 5'末端には Xbal site が付加してある)。cDNA の増幅、クローニング、塩

基配列決定は実施例1と同様の方法で行った。明らかになった配列を配列表 配列番号:23に示す。

同配列は 1110 base の open reading frame (配列番号: 23の第1番目から第1110番目)を持っている。 open reading frame から予測されるアミノ酸配列(370 アミノ酸)を配列表配列番号: 24に示す。予想アミノ酸配列はヒト SREB2 と 100% 一致していることから、本遺伝子が rSREB2 をコードすることが解った。

rSREB3 の 増 幅 に は forward primer と し て 5'-AAAATCTAGACAAATACTGAACTGGCCGATCCCC-3'(配列番号: 19)、reverse primer として 5'-AAAATCTAGA TGTTGGCCCCAGTATGGTGATCAT-3'(配列番号: 20)を用いた(それぞれの 5'末端には Xbal site が付加してある)。cDNA の増幅、クローニング、塩基配列決定は実施例1と同様の方法で行った。明らかになった配列を配列表 配列番号: 25に示す。

同配列は1119 base の open reading frame (配列番号:25の第1番目から第1119番目)を持っている。open reading frame から予測されるアミノ酸配列(373 アミノ酸)を配列表配列番号:26に示す。予想アミノ酸配列はヒト SREB3 と 99%一致していることから、本遺伝子が rSREB3 をコードすることが解った。

実施例 5 ヒト SREB1 に対する抗体の作製

ヒト SREB1 に対する抗体を作製するための免疫用抗原としてヒト SREB1 の部分アミノ酸配列をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)と融合したものを用いた。実際には、ヒト SREB1 のアミノ酸配列(配列番号2)の208番目から282番目の領域(3LO)および351番目から375番目の領域(C24)に相当する cDNA フラグメントに制限酵素 BamHI および Xhol 切断部位を結合した形でPCR 法にて増幅し、GST Gene Fusion Vector(pGEX-5X-1:アマシャムファルマシア社製)の BamHI、Xhol の間に挿入した。このように構築したプラスミドで、大腸菌 BL21(DE3) pLysS(Novagen 社製)のコンピテントセルを形質転換した。その

形質転換株を培養し、1mM IPTG にて発現誘導することで、GST-3LO 融合蛋白および GST-C24 融合蛋白を大腸菌内に発現させた。GST-3LO および GST-C24 は大腸菌破砕物から Glutathione Sepharose4B(アマシャムファルマシア社製)を用いて使用説明書に準じて精製した。

精製した GST-3LO 融合蛋白と Freund's complete adjuvant(CalBioChem 社)を等量混合しエマルジョン化したものを白色レグホン雌(140日齢)のフォアブリキュウス嚢付近に投与した。投与量は初回が 1mg でその後2週間おきに 0.5mg ずつ4回投与した。最終免疫後、採卵し、卵黄を生理食塩水で希釈後、デキストラン硫酸を用いて脱脂した後、DEAE Sepharose(アマシャムファルマシア社製)を用いて、lgYを精製し抗 3LO 抗体とした。また、精製した GST-C24 融合蛋白は TiterMax Gold(CytRX 社)と等量混合しエマルジョン化したものを日本白色ウサギ(6週齢)の背部皮下に投与した。投与量は初回が 1mg でその後2週間おきに 0.5mg ずつ2回投与した。最終免疫後、採血し、血清から、ProteinG Sepharose(アマシャムファルマシア社製)を用いて使用説明書に準じて、lgG を精製し抗 C24 抗体とした。

抗 3LO 抗体はヒト SREB1 のアミノ酸配列(配列番号2)の208番目から282番目の領域を抗原としていること、この部分アミノ酸配列は SREB1、SREB2または SREB3で共通する配列を多く含むこと(図1参照)から、抗 3LO 抗体は SREB1、SREB2または SREB3を共通に認識する可能性が考えられる。また、抗 C24 抗体はヒト SREB1 のアミノ酸配列(配列番号2)の351番目から375番目の領域を抗原としていること、この部分アミノ酸配列は SREB2、3 には存在せず SREB1 にのみ存在する配列であること(図1参照)から、抗 C24 抗体は SREB1 のみを認識する可能性が考えられる。そこで、抗 3LO 抗体および抗 C24 抗体の特異性を確認するために、実施例3で調製した SREB1、SREB2 または SREB3 を発現させた 293-EBNA の抗 FLAG 抗体の免疫沈降物と抗 3LO 抗体および抗 C24 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

実際には、SDS/10%~20% アクリルアミドゲル(第一化学薬品社)を用いて電気泳動後、ブロッティング装置を用いて PVDF 膜に転写した。 転写後の PVDF 膜に、ブロッキング後、

10 μ g/ml の抗 3LO 抗体、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ウサギ抗ニワトリ μ g ポリクローナル抗体 (μ g/ml の抗 C24 抗体、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ μ g ポリクローナル抗体 (μ g/ml の抗 C24 抗体、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ μ g ポリクローナル抗体 (μ g/ml の抗 C24 抗体、西洋わせるかした。反応後、ECL ウエスタンブロッティング検出システム (μ g/ml の抗 FLAG 抗体と同等の位置に μ g/ml の抗 FLAG 抗体と反応するパンドは実施例3の抗 FLAG 抗体と同等の位置に μ g/ml の抗 G24 抗体と同学が成功 G24 抗体と同学が成功 G24 抗体と同学が成功 G24 抗体と同学の位置に μ g/ml の抗 G24 抗体と反応するパンドは実施例3の抗 FLAG 抗体と同等の位置に μ g/ml G24 抗体と反応するパンドは実施例3の抗 FLAG 抗体と同学の位置に μ g/ml G24 抗体と同学が成功 G24 抗体と同学が成功 G24 抗体と同学が成功 G24 抗体 G2

以上の結果より、抗3LO抗体はSREB1、SREB2またはSREB3を認識する抗体であり、 抗C24 抗体はSREB1 のみを認識する抗体であることが示された。これらの抗体を用いる ことで、ウエスタンブロット法や免疫組織染色法等で天然の SREB1、SREB2 または SREB3を検出することが可能となった。

実施例6 ヒト SREB1、SREB2 または SREB3 導入細胞における cAMP-respons element(CRE)、serum response element(SRE)を介した転写活性の検討

CRE あるいは SRE を介した転写活性の上昇は、様々な G 蛋白質共役型レセプターの 細胞内情報伝達系の活性化に伴って引き起こされる(Lolait, S.J., et al. (1992) Nature, 357, 336-339; Hoeltzel, W.L., et al. (1997) Am. J. Physiol., 273, C2037-C2045; An, S., et al. (1998) J. Biol. Chem., 273, 7906-7910)。また、G 蛋白質共役型レセプターはアゴニスト非存在下でも一部の遷移的な活性型コンフォメーションを介して細胞内情報伝達系が部分的に活性化されることが知られている(Kenakin, T. (1995) Trens Pharmacol. Sci., 16, 188-192)。これらのことより、アゴニスト非存在下でも、SREB1、SREB2 または SREB3 導入細胞での CRE および SRE を介した転写活性の変化が見いだされれば、該 G 蛋白質共役型レセプターが機能的であること、また、該 G 蛋白質共役型レセプターの細胞内情報伝達系の活性化が CRE および SRE を介した転写活性とつながることを証明できる。

ヒト SREB1、SREB2 または SREB3 を発現させるための発現ベクターとして pEF-BOS

(Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322)を用い、pEF-BOS-SREB1、pEF-BOS-SREB2、pEF-BOS-SREB3 を作製した。24 ウェルプレートに 293-EBNA(Invitrogen 社)を 8x10⁴ 細胞で播種して1日培養後、250 ng の pEF-BOS-SREB1、pEF-BOS-SREB2、pEF-BOS-SREB3 および pEF-BOS(ベクターのみ)を 25 ng の CRE-reporter plasmid pCRE-Luc(Stratagene 社)あるいは SRE-reporter plasmid pSRE-Luc (Stratagene 社)と共に FuGENE6(Boeringer Mannheim 社)を用いて遺伝子導入した(各 3 ウェル)。遺伝子導入後、12 時間ごとに PicaGene Cell Culture Lysis Reagent Luc(ニッポンジーン社)を用いて細胞を溶解し、PicaGene Luminescence Kit(ニッポンジーン社)を用いて各 reporter plasmid から産生されるルシフェラーゼ活性を測定した。

遺伝子導入後 24 時間における SREB1、SREB2 または SREB3 を導入した細胞のルシフェラーゼ活性を、ベクターのみを導入した細胞(コントロール)のルシフェラーゼ活性に対する相対活性(コントロールを 1 とする)として処理した結果を図11(pCRE-Luc 由来のルシフェラーゼ活性)、図12(pSRE-Luc 由来のルシフェラーゼ活性)に示す。CRE を介した転写活性は SREB1 導入細胞で最も上昇し、SREB2、SREB3 導入細胞でもコントロールに対して有意に上昇していた。一方、SRE を介した転写活性は SREB2 導入細胞で最も上昇し、SREB1、SREB3 導入細胞で最も上昇し、SREB1、SREB3 導入細胞でもコントロールに対して有意に上昇していた。

これらの結果により SREB1、SREB2 または SREB3 が機能的レセプターであり、該 G 蛋白質共役型レセプターの細胞内情報伝達系の活性化が CRE あるいは SREを介した転写活性の上昇につながることが示された。

産業上の利用可能性

本発明により、中枢神経系に発現している新規なG蛋白質共役型レセプターファミリー 蛋白質 SREB1、SREB2 または SREB3、該蛋白質をコードする遺伝子、該遺伝子を含むべ クター、該ベクターを含む宿主細胞、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法が 提供された。 また、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質と被験薬を接触させることにより、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングし、新たな医薬、特に、新たな中枢性疾患治療剤をスクリーニングすることを可能にした。

本発明の中枢神経系に発現しているG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を特異的に修飾する化合物、ペプチド及び抗体を有効成分とする医薬は、中枢神経系の機能性/器質性疾患の治療薬剤等としての有用性が期待できる。また、本発明のG蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質は中枢神経系のみならず、泌尿器生殖器系で発現していることから、その活性を特異的に修飾する化合物、ペプチド及び抗体を有効成分とする医薬は泌尿器生殖器系に関わる疾患の治療薬剤等としての有用性が期待できる。また、本発明のG蛋白質共役型レセプターの内例えば SREB1 蛋白質は中枢神経系、泌尿器生殖器系に加え、心臓、末梢白血球で発現していることから SREB1 蛋白質の活性を特異的に修飾する化合物、ペプチド及び抗体を有効成分とする医薬は中枢性疾患、泌尿器生殖器系に関わる疾患に加え循環器系疾患、免疫炎症系疾患の治療薬剤等としての有用性が期待できる。

本発明新規G蛋白質共役型レセプターファミリーSREB1、SREB2 または SREB3 はヒトとラットでアミノ酸の保存率が極めて高い。この保存率は既存のG蛋白質共役型レセプターファミリーの中で最も高く、このことは新規G蛋白質共役型レセプターファミリーSREB1、SREB2、及び SREB3 の生体内での役割、特に中枢神経系での生理的役割の重要性を示していると考えられる。また、ヒトとラットでアミノ酸配列が 97%以上の保存率を示していることから、本新規G蛋白質共役型レセプターファミリーSREB1、SREB2 または SREB3 に作用する薬物の活性には種差が殆ど無いと考えられる。従って、本発明のG蛋白質共役型レセプターは、それ自体又は当該レセプターを用いたスクリーニングから得られた化合物又は蛋白質を医薬として開発する際、ヒトに対する薬理効果を試験するに先立って、予め、例えばラット等の動物実験を行うことができるという利点があり、動物実験データからデータからヒトの臨床データを予測することが容易である点で有用である。

本発明G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体は、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の臓器での発現およびその変動を ELISA アッセイ、ラジオイムノアッセイ、ウエスタンブロット法等によって検出することが可能であり、診断薬として有用である。また、該新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する抗体は該新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質が関与する疾患の治療薬として、さらに該レセプター蛋白質の分離精製の道具としても有用である。

請求の範囲

- 1. 配列番号: 2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列を有しているG蛋白質共役型レセプター蛋白質、あるいは、該蛋白質の同効物であるG蛋白質共役型レセプター蛋白質。
- 2. 配列番号: 2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列を有するG蛋白質共役型 レセプター蛋白質。
- 3. 請求の範囲1に記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を 有する遺伝子。
- 4. 請求の範囲3記載の遺伝子を含むベクター。
- 5. 請求の範囲4記載のベクターを含む宿主細胞。
- 6. 請求の範囲5記載の宿主細胞を用いる請求の範囲1または乃至2記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、あるいは、該蛋白質の同効物であるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法。
- 7. 請求の範囲1または2記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質と被験化合物とを接触させ、当該G蛋白質共役型レセプター蛋白質作用薬をスクリーニングする方法。
- 8. 請求の範囲1または2記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドに対する抗体またはその断片。

図1 SREB 1 MANASEPGGSGGEAAALG---LKLATLSLLLCVSLAGN 36
SREB 2 MANYSHAADNILQNLSP--LTAFLKLTSLGFIIGVSVVGN 38
SREB 3 MANTTGEPEEVSGALSPPSASAYVKLVLLGLIMCVSLAGN 40 SREB 1 V L F A L L I V R E R S L H R A P Y Y L L L D L C L A D G L R A L A C L P A V M 76
SREB 2 L L I S I L L V K D K T L H R A P Y Y F L L D L C C S D I L R S A I C F P F V F 78
SREB 3 A I L S L L V L K E R A L H K A P Y Y F L L D L C L A D G I R S A V C F P F V L 80 SREB 1 LAARRAAAAAAAAGAPPGALGCKLLAFLAALFCFHAAFLLLGV 116
SREB 2 NSVKNGSTWTY---GTLTCKVIAFLGVLSCFHTAFMLFCI 115
SREB 3 ASVRHGSSWTF---SALSCKIVAFMAVLFCFHAAFMLFCI 117 SREB 1 G V TRYLAIAHHRFYAERLAG W P CAAML V CAAWALALAAAF 156 SREB 2 S V TRYLAIAHHRFY T KRL T F W T C LAV - I C M V W T L S V AMAF 154 SREB 3 S V TRY M A I A H H R F Y A K R M T L W T C A A V - I C M A W T L S V A M A F 156 SREB 1 PPVLDGGG---DDEDAPCALEORPDGAPGALGFLLLLAVV 193
SREB 2 PPVLDVGTYSFIREEDQCTFCHRSFRANDSLGFMLLLALI 194
SREB 3 PPVFDVGTYKFIREEDQCIFEHRYFKANDTLGFMLMLAVL 196 SREB 1 V G ATHLVYL R L L F F I H D R R K M R P A R L V P A V S H D W T F H G P G 233
SREB 2 L L A T Q L V Y L K L I F F V H D R R K M K P V Q F V A A V S Q N W T F H G P G 234
SREB 3 M A A T H A V Y G K L L L F E Y R H R K M K P V Q M V P A I S Q N W T F H G P G 236 SREB 1 ATGQAAANW TAGFGRGPTPPALVGIRPAGPGRGARRLLVL 273
SREB 2 ASGQAAANW LAGFGRGPTPPTLLGIRQNANTTGRRRLLVL 274
SREB 3 ATGQAAANW IAGFGRGPMPPTLLGIRQNGHAASRR-LLGM 275 SREB 1 EEFKTEKRLCKMFYAVTLLFLLWGPYVVASYLRVLVRPG 313 SREB 2 DEFKMEKRIS RMFYIMTFLFLTLWGPYLVACYWRVFARGP 314 SREB 3 DEVKGEKQLGRMFYAITLLFLLWSPYIVACYWRVFVKAC 315 SREB 1 AVPQAYLTASVWLTFAQAGINPVVCFLFNRELRDCFRAQF 353
SREB 2 VVPGGFLTAAVWMSFAQAGINPFVCIFSNRELRCFSTTL 354
SREB 3 AVPHRYLATAVWMSFAQAAVNPIVCFLLNKDLKKCLRTHA 355 SREB 1 P C C Q S P R T T Q A T H P - - C D L K G I G L .
SREB 2 L Y C R K S - - - R L P R E P Y C - - - - V I .
SREB 3 P - C W G T G G A P A P R E P Y C - - - - V M . 376 371 374

図2

1.4 1.4 4.4. 4.4.

> 心臓 脳

胎盤

肺

肝臓

骨格筋

腎臓

膵臓

7.5-

脾胸前精卵小大臟腺立巣巣腸腸

末梢血白血球

PCT/JP99/01191

3/10

図3

7.5

扁尾脳海全黒視 桃状梁馬脳質床 下

視床

9.5— 7.5— 4.4—

図4

1 4 1 2.4-

4-4-1

9.5₋

心臓

脳

胎盤

肺

肝臓

骨格筋

腎臓

膵臓

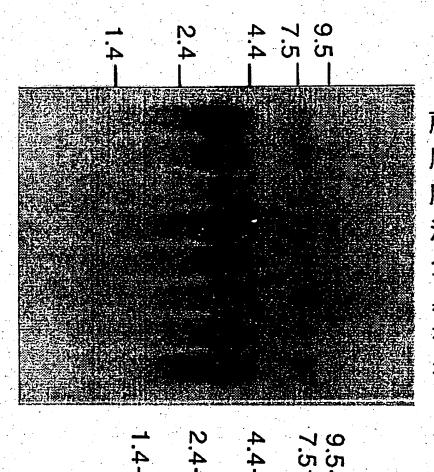
9.5-7.5-1.4-

胸前精卵小大腺单巢腸腸

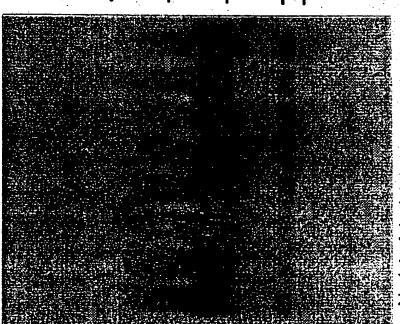
末梢血白血球

脾臓

図5

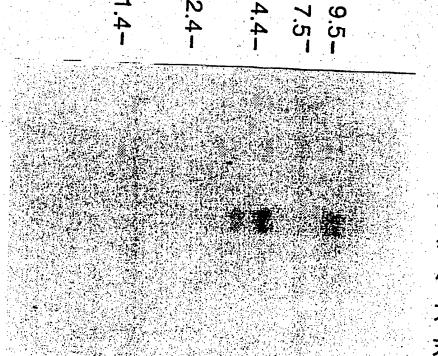


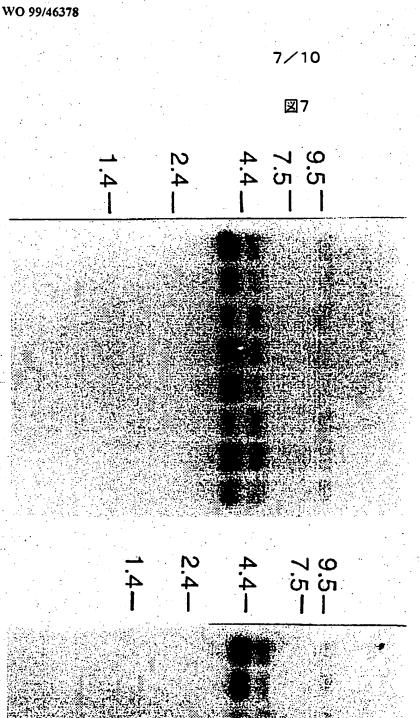
扁尾脳海全黒視視体核 梁馬脳質床床



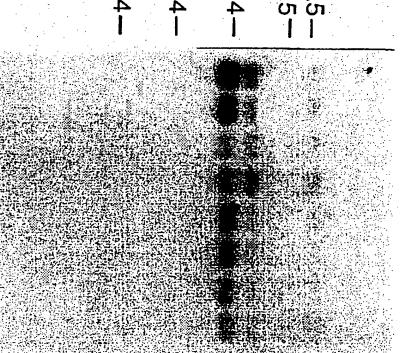
6/10 図6 7.5-2.4-

心脳胎肺肝骨腎膵臓 盤 臓格臓臓





扁桃体 尾状核 脳梁 海馬 全脳 黒質 視床下核 視床

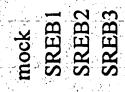


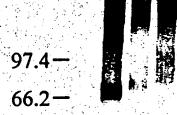
小脳 大脳皮質 延髄 脊髄 大脳皮質後頭葉 大脳皮質前頭葉 大脳皮質側頭葉 被殻

WO 99/46378 PCT/JP99/01191

8/10

図8





30.3**—**

20.1 —

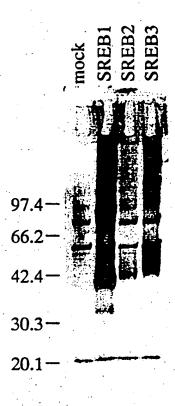
anti-FLAG

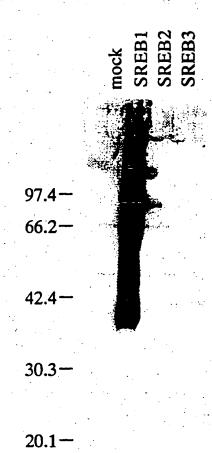
WO 99/46378

9/10

図9

図10





anti-3LO

anti-C24

WO 99/46378 PCT/JP99/01191

図11

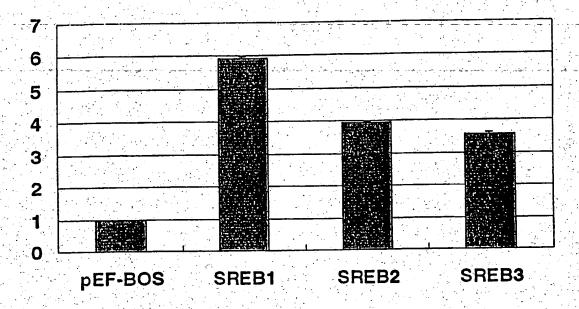
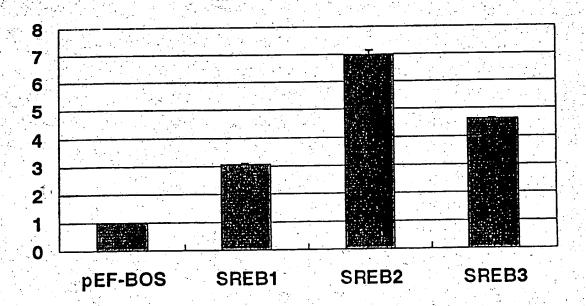


図12



SEQUENCE LIST

								31	ENOE	NUE	T191				,
<110>	Yamaı	noucl	i Pl	harma	aceu	tica	I Co.	.,	Ltd.						•
<120>	A nor	vel (pro	oteir	1 CO	ple	d red	cepto	or p	rote	in Ţ	٠,		•	
<130>	`Y990	5-PC1	Γ.											• •	
<150> <151>				245	•	•	• : •		·. •						
<150> <151>				74							•				
<160>	26		- 1		•	•			· .		. *		•		
<170>	Paten	tin	Ver.	2.0	1								•		
<210> <211> <212> <213>	1128 DNA		ens				•						 :		
<220><221><222><223>	(1)	(112	5)					*							
<400> atg go		gcg	agc	gag	ccg	ggt	ggc	agc	ggc	ggC	eec	225	 ece	PCC	48
Met Al	a Asn	Ala	Ser 5	Glu	Pro	Gly	Gly	Ser 10	Gly	Gly	Gly	Glu	Ala 15	Ala	
gcc ct Ala Le	g ggc u Gly	ctc Leu 20	aag Lys	ctg Leu	gcc Ala	acg Thr	ctc Leu 25	Ser	ctg Leu	ctg Leu	ctg Leu	tgc Cys -30	gtg Val	agc Ser	96
cta gc Leu Al	g ggc a Gly 35	aac Asn	gtg Val	ctg Leu	ttc Phe	gcg Ala 40	ctg Leu	ctg Leu	atc lle	gtg Val	cgg Arg 45	gag Glu	cgc Arg	agc Ser	144
ctg ca Leu Hi 5	s Arg	gcc Ala	ccg Pro	tac Tyr	tac Tyr 55	ctg Leu	ctg Leu	c t c Leu	gac Asp	ctg Leu 60	tgc Cys	ctg Leu	gcc Ala	gac Asp	192
ggg ct Gly Le 65	g cgc u Arg	gcg Ala	ctc Leu	gcc Ala 70	tgc Cys	ctc Leu	ccg Pro	gcc Ala	gtc Val 75	atg Met	ctg Leu	gcg Ala	gcg Ala	cgg Arg 80	240
cgt gc Arg Al	g gcg a Ala	gcc Ala	gcg Ala 85	gcg Ala	ggg Gly	gcg Ala	ccg Pro	ccg Pro 90	ggc Gly	gcg Ala	ctg Leu	ggc Gly	tgc Cys 95	aag Lys	288
ctg ct Leu Le	c gcc u Ala	ttc Phe 100	ctg Leu	gcc Ala	gcg Ala	ctc Leu	ttc Phe 105	tgc Cys	ttc Phe	cac His	gcc Ala	gcc Ala 110	ttc Phe	ctg Leu	336

ctg Leu	ctg Leu	ggc Gly 115	Val	ggc Gly	gto Val	acc Thr	cgc Arg 120	Tyr	c t g Leu	gcc	_atc	gcg Ala 125	His	cac His	cgc Arg	384
t t c Phe	tat Tyr 130	Ala	gag Glu	cgc Arg	Leu	gcc Ala 135	. Gly	tgg Trp	ccg Pro	tgc Cys	gcc Ala 140	Ala	atg Met	ctg Leu	gtg Val	432
tgc Cys 145	Ala	gcc Ala	tgg Trp	gcg Ala	ctg Leu 150	Ala	ctg Leu	gcc Ala	gcg Ala	gcc Ala 155	Phe	ccg Pro	cca Pro	gtg Val	ctg Leu 160	480
gac Asp	ggc Gly	ggt Gly	ggc	gac Asp 165	Asp	gag Glu	gac Asp	gcg Ala	ccg Pro 170	tgc Cys	gcc Ala	ctg Leu	gag Glu	cag Gin 175	cgg Arg	528
Pro	Asp	Gly	A1a 180	Pro	Gly	Ala	Leu	Gly 185	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu 190	gcc Ala	Val	576
Val	Val	G1y 195	Ala	Thr	His	Leu	Va I 200	Tyr	Leu	Arg	Leu	Leu 205	Phe	ttc Phe	lle	624
His	Asp 210	Arg	Arg	Lys	Me t.	Arg 215	Pro	Ala	Arg	Leu	Val 220	Pro	Ala	Val		672
His 225	Asp	Trp	Thr	Phe	His 230	Gly	Pro	Gly	Ala	Thr 235	Gly	Gin	Ala	gcc Ala	Ala 240	720
Asn	Trp	Thr	Ala	Gly 245	Phe	Gly	Arg	Gly	Pro 250	Thr	Pro	Pro	Ala	Leu 255	·	768
Gly.	lle	Arg	Pro 260	Ala	Gly	Pro	Gly	Arg 265	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu 270	ctc Leu	Val	816
Leu	Glu	G1 u 275	Phe	Lys	Thr	Glu	Lys 280	Arg	Leu	Cys	Lys	Me t 285	Phe	Tyr	Ala	
Val	Thr 290	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu 295	Leu	Trp	Gly	Pro	Tyr 300	Val	Val	gcc Ala	Ser	912
Tyr 305	Leu	Arg	Val	Leu	Val 310	Arg	Pro	Gly	Ala	Val 315	Pro	GIn	Ala	tac Tyr	Leu 320	960
Thr	Ala	Ser	Val	Trp 325	Leu	Thr	Phe	Ala	Gin 330	Ala	ggc Gly	lle	aac Asn	ccc Pro 335	Val	1008

					Phe					Arg					Ala	cag	1056
. •	t t c	Pro	tgo Cys 355	Cys	cag Gln	agc Ser	ccc Pro	cgg Arg 360	Thr	acc Thr	cag Gln	gcg Ala	acc Thr 365	His	ccc Pro	tgc Cys	1104
			Lys			ggt		· ·						: .			1128
	<21 <21	0> 2 1> 3 2> P 3> H	75 RT	sapi	ens										•		
	<40	0> 2				Glu	Pro	Gly	Gly	Ser 10	Gly	Gly	Gly	Glu	Ala 15	Ala	
	Ala	Leu	Gly	Leu 20	Lys	Leu	Ala	Thr	Leu 25	Ser	Leu	Leu	Leu	Cys 30	Val	Ser	
	Leu	Ala	Gly 35		Va l	Leu	Phe	Ala 40	Leu	Leu	ile	Val	Arg 45	Glu	Arg	Ser	
		50					55		Leu			60	•.			:	•• • • • • • • • • • • • • • • • • • •
	65					70		·	Pro		75		•			80	
		· · ·			85				Pro	90			•		95		
				100					Phe 105			٠.		110		•	
			115	:	:			120	Tyr	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •			125		•		
		130					135		Trp		. •	140					
	145					150			Ala		155		•	٠.		160	-
	•				165			•	Gly	170					175		
				180		3		·:	185					190	,,, a	741	

Val Val Gly Ala Thr His Leu Val Tyr Leu Arg Leu Leu Phe Phe Ile 200 His Asp Arg Arg Lys Met Arg Pro Ala Arg Leu Val Pro Ala Val Ser His Asp Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Thr Gly Gln Ala Ala Ala 235 Asn Trp Thr Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Ala Leu Val 245 Gly lle Arg Pro Ala Gly Pro Gly Arg Gly Ala Arg Arg Leu Leu Val Leu Glu Glu Phe Lys Thr Glu Lys Arg Leu Cys Lys Met Phe Tyr Ala 280 Val Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Gly Pro Tyr Val Val Ala Ser 290 Tyr Leu Arg Val Leu Val Arg Pro Gly Ala Val Pro Gin Ala Tyr Leu Thr Ala Ser Val Trp Leu Thr Phe Ala Gin Ala Gly lle Asn Pro Val Val Cys Phe Leu Phe Asn Arg Glu Leu Arg Asp Cys Phe Arg Ala Gln 345 Phe Pro Cys Cys Gln Ser Pro Arg Thr Thr Gln Ala Thr His Pro Cys Asp Leu Lys Gly Ile Gly Leu 370 <210> 3 <211> 1113 <212> DNA <213> Homo sapiens **<220>** <221> CDS **<222> (1)...(1110)** <223> SREB2 <400> 3 atg gcg aac tat agc cat gca gct gac aac att ttg caa aat ctc tcg Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn lle Leu Gln Asn Leu Ser cct cta aca gcc ttt ctg aaa ctg act tcc ttg ggt ttc ata ata gga Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe lle lle Gly

gto Val	s ago Ser	gtg Val 35	Val	g gg q Gly	aac Asn	c t c Leu	ctg Leu 40	Пe	tcc Ser	att	t t g Leu	cta Leu 45	Val	aaa Lys	ga t Asp	144
aag Lys	acc Thr 50	Leu	cat His	aga Arg	gca Ala	cct Pro 55	Tyr	tac Tyr	t t c Phe	ctg Leu	ttg Leu 60	gat Asp	ctt Leu	tgc Cys	tgt Cys	192
tca Ser 65	Asp	atc	ctc Leu	aga Arg	tct Ser 70	Ala	att He	tgt Cys	ttc Phe	cca Pro 75	ttt Phe	gtg Val	ttc Phe	aac Asn	tct Ser 80	240
gtc Val	aaa Lys	aat Asn	ggc Gly	tct Ser 85	Thr	tgg Trp	act Thr	tat Tyr	ggg Gly 90	act Thr	ctg Leu	act Thr	tgc Cys	aaa Lys 95	gtg Val	288
att	gcc Ala	t t t Phe	ctg Leu 100	Gly	gtt Val	ttg Leu	tcc Ser	tgt Cys 105	ttc Phe	cac His	act Thr	gct Ala	ttc Phe 110	atg Met	ctc Leu	336
t t c Phe	tgc Cys	atc lle 115	agt Ser	gtc Val	acc Thr	aga Arg	tac Tyr 120	t t a Leu	gct Ala	atc	gcc Ala	cat His 125	cac His	cgc Arg	ttc Phe	384
tat Tyr	aca Thr 130	aag Lys	agg Arg	ctg Leu	acc Thr	tit Phe 135	tgg Trp	acg Thr	tgt Cys	ctg Leu	gct Ala 140	gtg Val	atc	tgt Cys	atg Met	432
gtg Vai 145	tgg Trp	act Thr	ctg Leu	tct Ser	gtg Val 150	gcc Ala	atg Met	gca Ala	ttt Phe	ccc Pro 155	ccg Pro	gtt Val	tta Leu	gac Asp	gtg Val 160	480_
ggc Gly	act Thr	tac Tyr	tca Ser	ttc Phe 165	att	agg Arg	gag Glu	gaa Glu	gat Asp 170	caa Gin	tgc Cys	acc Thr	ttc Phe	caa Gln 175	cac His	528
					aat Asn											576
ctc Leu	atc He	ctc Leu 195	cta Leu	gcc Ala	aca Thr	cag GIn	ctt Leu 200	gtc Val	tac Tyr	c t c Leu	aag Lys	ctg Leu 205	ata He	ttt Phe	ttc Phe	624
Val	cac His 210	gat Asp	cga Arg	aga Arg	aaa Lys	atg Met 215	aag Lys	cca Pro	gtc Val	cag Gin	ttt Phe 220	gta Val	gca Ala	gca Ala	gtc Val	672
agc Ser 225	cag GIn	aac Asn	tgg Trp	act Thr	ttt Phe 230	cat His	ggt Gly	cct Pro	gga Gly	gcc Ala 235	agt Ser	ggc Gly	cag Gln	Ala	gct Ala 240	720
gcc Ala	aat Asn	tgg Trp	cta Leu	gca Ala 245	gga Gly	ttt Phe	gga Gly	Arg	ggt Gly 250	ccc Pro	aca Thr	cca Pro	ccc Pro	acc Thr 255	t t g Leu	768

	:.	:									0/	4					9 5 L 1 7
C L	tg eu	ggc Gly	ati	c ag e Ar 26	g G	aa aa In As	at go sn Al	a aa a As	c acc n Thi 265	r_Th	a ggo r Gly	aga Arg	aga Arg	agg Arg 270	c t a Leu	t t g Leu	816
g i Va	lc il	tta Leu	. V2	ga G G I	u Pr	tc aa ie Ly	a at	g ga t GI 28	u Lys	a ag S Ar	a ato	agc Ser	aga Arg 285	atg Met	ttc Phe	tat Tyr	864
a t I I	E 1	atg Met 290	act Thr	t t Ph	t ct e Le	g tt u Ph	t ct e Le 29	u Ih	c ttg r Leu	tgi Tri	g ggc p Gly	ccc Pro 300	tac Tyr	ctg Leu	gtg Val	gcc Ala	912
t g Cy 30	2	tat Tyr	tgg Trp	ag: Ar	agt gVa	t tt I Ph 31	e Al	a aga a Arg	a ggg g Gly	cc Pro	t gta Val 315	gta Val	cca Pro	ggg Gly	gga Gly	ttt Phe 320	960
ct Le	a a u T	nca hr	gct Ala	gc Ala	gt Va 32	I Ir	g at	g agt t Ser	t ttt Phe	gco Ala 330	caa Gln	gca Ala	gga Gly	He	aat Asn 335	cct Pro	1008
t t Ph	t g e V	t c a l	tgc Cys	ati 11e 340	Ph	c tc: e Se	a aad r Asi	c agg n Arg	gag Glu 345	Leu	agg Arg	cgc Arg	tgt Cys	ttc Phe 350	agc Ser	aca Thr	1056
ace Th	C C	eu	ctt Leu 355	tac Tyr	t ge Cy:	c aga s Arg	a aaa g Lys	tcc Ser 360	Arg	tta Leu	cca Pro	Arg,	gaa Glu 365	cct Pro	tac Tyr	tgt Cys	1104
gt i Val	i		tga														1113
<21 <21 <21	1>	37															
				арі	ens					.' '				. • .			
<40	٥٧.	4											· · · .	٠			
			Asn	Týr	Ser 5	His	Ala	Ala	Asp	Asn 10	lle	Leu (in A	sn L	eu :	Ser	
	٠.			20	•				25	٠.,	Leu			30			
			35					40			lle		45		:		
	5	U					. 55		•		Leu l	60			•		
00	-		•			70					Pro F 75		, ·			80	
Va I	Ly	s A	sn (il y	Ser 85	Thr	Trp	Thr	Tyr (90	Thr L	.eu T	hr C		ys V 95	àl	and the second s

He	: Ala	Phe	100		Va!	Leu	ı Ser	Cys	Phe	His	Thr	Ala	Phe 110		Leu
Phe	Cys	116 115		Val	Thr	Arg	Tyr 120		Ala	lle	Ala	His 125		Arg	Phe
Tyr	Thr 130		Arg	Leu	Thr	Phe 135		Thr	Cys	Leu	Ala 140		lle	Cys	Met
Val 145	Trp	Thr	Leu	Ser	Val 150		Met	Ala	Phe	Pro 155		Val	Leu	Asp	Val 160
Gly	Thr	Tyr	Ser	Phe 165		Arg	Glu	Glu	Asp 170		Cys	Thr	Phe	GIn 175	
Arg	Ser	Phe	Arg 180	Ala	Asn	Asp	Ser	Leu 185	Gly	Phe	Met	Leu	Leu 190	Leu	Ala
Leu	ile	Leu 195	Leu	Ala	Thr	Gin	Leu 200	Val	Tyr	Leu	Lys	Leu 205	lle	Phe	Phe
Val	His 210	Asp	Arg	Arg	Lys	Me t 215	Lys	Pro	Val	Gin	Phe 220	Val	Ala	Ala	Val
Ser 225	GIn	Asn	Trp	Thr	Phe 230	His	Gly	Pro	Gly	Ala 235	Ser	Gly	GIn	Ala	Ala 240
Ala	Asn	Trp	Leu	A1a 245	Gly	Phe	Gly	Arg	Gly 250	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr 255	Leu
Leu	Gly	He	Arg 260	Gin	Asn	Ala	Asn	Thr 265	Thr	Gl <u>y</u>	Arg	Arg	Arg 270	Leu	Leu
Val	Leu	Asp 275	Glu	Phe	Lys	Met	G1 u 280	Lys	Arg	lle	Ser	Arg 285	Met	Phe	Tyr
lle	Me t 290	Thr	Phe	Leu	Phe	Leu 295	Thr	Leu	Trp	Gly	Pro 300	Tyr	Leu	Val	Ala
Cys 305	Tyr	Trp	Arg	Val	Phe 310	Ala	Arg	Gly	Pro	Val 315	Val	Pro	Gly	Gly,	Phe 320
Leu	Thr	Ala	Ala	Val 325	Trp	Met	Ser	Phe	Ala 330	GIn	Αlá	Gly	lle	Asn 335	Pro
Phe	Val	Cys	11e 340	Phe	Ser	Asn	Arg	Glu 345	Leu	Arg	Arg	Cys	Phe 350	Ser	Thr
Thr	Leu	Leu 355	Tyr	Cys	Arg	Lys	Ser 360	Arg	Leu	Pro	Arg	Glu 365	Pro	Tyr	Cys
Val	11e 370		•	•			•				•				.*

<210> 5 <211> 1122 <212> DNA <213> Homo					
<220> <221> CDS <222> (1) <223> SREB3					
<400> 5 atg gcc aac Met Ala Asn 1	act acc ggs Thr Thr Gly 5	gag cct Glu Pro	gag gag gtg Glu Glu Val 10	agc ggc gci Ser Gly Ala	t ctg tcc 48 a Leu Ser 15
cca ccg tcc Pro Pro Ser	gca tca gct Ala Ser Ala 20	tat gtg Tyr Val	aag ctg gta Lys Leu Val 25	ctg ctg gga Leu Leu Gly 30	ctg att 96 Leu lle
Met Cys Val	Ser Leu Ala	Gly Asn 40	Ala ile Leu	Ser Leu Leu 45	
Lys Glu Arg 50	Ala Leu His	Lys Ala 55	Pro Tyr Tyr	ttc ctg ctg Phe Leu Leu 60	Asp Leu
Cys Leu Ala 65	Asp Gly lle 70	Arg Ser	Ala Val Cys 75	ttc ccc ttt Phe Pro Phe	Val Leu 80
gct tct gtg Ala Ser Val	cgc cac ggc Arg His Gly 85	tct tca Ser Ser	tgg acc ttc Trp Thr Phe 90	agt gca ctc Ser Ala Leu	agc tgc 288 Ser Cys 95
aag att gtg Lys lie Val	gcc ttt atg Ala Phe Met 100	Ala Val i	ctc ttt tgc Leu Phe Cys 105	ttc cat gcg Phe His Ala 110	gcc ttc 336 Ala Phe
atg ctg ttc Met Leu Phe 115	tgc atc agc Cys lle Ser	gtc acc (Val Thr / 120	cgc tac atg Arg Tyr Met	gcc atc gcc Ala ile Ala 125	cac cac 384 His His
cgc ttc tac Arg Phe Tyr 130	gcc aag cgc Ala Lys Arg	atg aca (Met Thr l 135	ctc tgg aca Leu Trp Thr	tgc gcg gct Cys Ala Ala 140	gtc atc 432 Val lie
tgc atg gcc Cys Met Ala 145	tgg acc ctg Trp Thr Leu 150	tct gtg g Ser Val A	gcc atg gcc Ala Met Ala 155	ttc cca cct Phe Pro Pro	gtc ttt 480 Val Phe 160
gac gtg ggc Asp Val Gly	acc tac aag Thr Tyr Lys 165	ttt att o Phe lle A	egg gag gag Arg Glu Glu 170	Asp Gin Cys	atc ttt 528 lle Phe 175
gag cat cgc	tac ttc aag	gcc aat g	gac acg ctg	ggc ttc atg	ctt atg 576

<210> 6
<211> 373
<212> PRT
<213> Homo sapiens

		. "									-					
Glu	His	Arg	Tyr 180		Lys	Ala	Asn	Asp 185	Thr	Leu	Gly	Phe	Me t 190		Met	
			Leu					His		gtc Val			Lys			624
		Glu								cca Pro		Gin				672
gcc Ala 225	11e	agc Ser	cag Gin	aac Asn	tgg Trp 230	aca Thr	ttc Phe	cat His	ggt Gly	ccc Pro 235	ggg Gly	gcc Ala	acc Thr	ggc Gly	cag Gin 240	720
gct Ala	gc t Ala	gcc Ala	aac Asn	tgg Trp 245	atc	gcc Ala	ggc Gly	ttt Phe	ggc Gly 250	cgt Arg	ggg Gly	ccc Pro	atg Met	cca Pro 255	cca Pro	768
acc Thr	ctg Leu	ctg Leu	ggt Gly 260	lle	cgg Arg	cag Gin	aat Asn	ggg Gly 265	cat His	gca Ala	gcc Ala	agc Ser	cgg Arg 270	cgg Arg	cta Leu	816
ctg Leu	ggc Gly	atg Met 275	gac Asp	gag Giu	gtc Val	aag Lys	ggt Gly 280	gaa Glu	aag Lys	cag Gln	ctg Leu	ggc Gly 285	cgc Arg	atg Met	ttc Phe	864
tac Tyr	gcg Ala 290	atc	aca Thr	ctg Leu	ctc Leu	ttt Phe 295	ctg Leu	ctc Leu	c t c Leu	tgg Trp	tca Ser 300	ccc Pro	tac Tyr	atc	gtg Val	912
gcc Ala 305	tgc Cys	tac Tyr	tgg Trp	cga Arg	gtg Val 310	ttt Phe	gtg Val	aaa Lys	gcc Ala	tgt Cys 315	gct Ala	gtg Val	ccc Pro	cac His	cgc Arg 320	960
tac Tyr	ctg Leu	gcc Ala	act Thr	gct Ala 325	Val	tgg Trp	atg Met	agc Ser	ttc Phe 330	gcc	cag Gln	gct Ala	gcc Ala	gtc Val 335	aac Asn	1008
cca Pro	att	gtc Val	tgc Cys 340	ttc Phe	ctg Leu	ctc Leu	aac Asn	aag Lys 345	gac Asp	ctc Leu	aag Lys	aag Lys	tgc Cys 350	ctg Leu	agg Arg	1056
act Thr	cac His	gcc Ala 355	ccc Pro	tgc Cys	tgg Trp	ggc Gly	aca Thr 360	gga Giy	ggt Gly	gcc	ccg Pro	gct Ala 365	ccc Pro	aga Arg	gaa Glu	1104
		tgt Cys			tga											1122

				of Artis	٠, ٠,	- 1	111		11.					: :	
	0> 6			_,	٠.		_			•					
Met	Ala	Asn	Inr	ihr	Gly	Glu	Pro	GIш	Glu	Val	Ser	Gly	Αla	Leu	Ser
* . .				5					10		·			15	
Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Ala	Tvr	Val	lve	Len	Val	Len	Len	CIV	ىرم ا	lle
		•••	20			g***		25			LCU	Leu	30	Leu	116
			ے تھے۔ ریا	7,34							Ch -		-,	÷ ÷	
Me t	Cys	Val	Ser	Leu	Ala	Gly	Asn	Ala	Tle	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Leu
estan person	and the second	<u>.</u> 35	ر. رسو ای محدد		Sina		40		بعاده د په	, i ji i Sarajinka sa	ا ئاس	45	1		ران. دادگروشها داد
Lys		Arg	Ala	Leu	HIS		Ala	Pro	Tyr	Tyr		Leu	Leu	Asp	Leu
	50					55					60		op¥ e Jere	*	
Cvs	leu	Ala	Asn	GIV	lie	Are	Ser	Ala	Val	Cve	Phe	Pro	Pha	Val	انم ا
65			,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,		70			•		75					80
	. 3.					د کار داد. ماد داد			£ .		*		ir. Nedija	*	
Ala	Ser	Val	Arg	His	Gly	Ser	Ser	Trp	Thr	Phe	Ser	Ala	Leu	Ser	Cys
				85	, 43 %				90		e e .			95	
				DI:					•						
Lys	116	vai	100	rne	Met	Ala	val	Leu	Phe	Cys	Phe	His	Ala	Ala	Phe
		•	. 100					105	• • • • •	1			110		
Met	Leu	Phe	Cvs	He	Ser	Val	Thr	Arg	Tvr	Met	Ala	He	Ala	His	His
	7	115				·- Ŧ '	120					125	,,,, <u>,</u>	4.	
						• 1.				100		: .	*** :		
Arg	Phe	Tyr	Ala	Lys	Arg		Thr	Leu	Trp	Thr	Cys	Ala	Ala	Val	lle
	130					135			g de la companya di salah di s Salah di salah di sa		140				
Cve	Ha+		Trn	The		205	Val	Ala	Hat	A1.	Dha	· .	D		Phe
145	MET	nia	110	1111	150	261	Val	Ala	met	155	rne	Pro	Pro	vai	160
	Š, ji s						*				•••				100
Asp	Val	Gly	Thr	Tyr	Lys	Phe	lle	Arg	Glu	Glu	Asp	Ğİn	Cys	He	Phe
		St. W	ed .	165	T	-, 1		: : : : : : : : : : : : : : : : : : :	170					175	
										:			ş		
Glu	HIS			Phe	Lys	Ala	Asn	Asp	Thr	Leu	Gly	Phe		Leu	Met
			180					185	Ng.				190		. B. S.
Leu	Ala	Val	ieu	Met	Ala	Ala	Thr	His	Δla	Val	Tur	Clv	lve	Lau	Leu
		195			71.4	,,,,	200	7	ΛIα	141	, ,	205	Lys	LCU	Leu
**					· · · .					``:	4. ar.*]			•	
Leu	Phe	Glu	Tyr	Arg	His	Arg	Lys	Met	Lys	Pro	Val	Gin	Met	Val	Pro
· .	210				• •. •	215		•			220		100		
41.					-	- .							_:		
	116	ser	GIN	ASN		inr	Phe	His	Gly		Gly	Ala	Thr	Gly	
225		* * **			230		٠.	•		235	·.	•			240
Ala	Ala	Ala	Asn	Trn	He	Ala	Ğİv	Phe	GIV	Aro	Glv	Pro	Mat	Pro	Pro
	,			245				:	250	6	417			255	
	:	•			•							٠			•. •
Thr	Leu	Leu	Gly.	He	Arg	Gln	Asn	Gly	His	Ala	Ala	Ser	Arg	Arg	Leu
			260		; ; ·	. *		265					270		
	<u> </u>	12			.,		•	•							
ren	uly	Met -	ASD	GIU	val	Lys	G y	Glu	Lys	GIn	Leu	Gly	Arg	Met	Phe

			•		*	٠.	·	· . '		,	- 1					-
Tyr	Ala 290		Thr	Leu	Leu	Phe 295		Leu	Leu	Trp	Ser 300	Pro	Tyr	He	Val	· ·
			4.5						: '							
Ala 305	Cys	Tyr	Trp	Arg	Val 310		Val	Lys	Ala	Cys 315	Ala	Val	Pro	His	Arg 320	
Tyr	Leu	·Ala	Thr	Ala 325	Val	Trp	Met	Ser	Phe 330	Ala	Gln	Ala	Ala	Va I 335	Asn	
		•				'	• . •	,							-	
Pro	lle	Val	Cys 340	Phe	Leu	Leu	Asn	Lys 345	Asp	Leu	Lys	Lys	Cys 350	Leu	Arg	
Thr	His	Ala 355	Pro	Cys	Trp	Gly	Thr 360	Gly	Gly	Ala	Pro	Ala 365	Pro	Arg	Glu	
Dro	, Tu =	Сил	V-1	N.A			. •	.*	٠.	-					•	
	370	CAZ	Val	мет			٠.									•
							•	:			•		:		٠.	
				•	* **.	• '			٠٠				-	•••	·	
<210 <211					· · · · · ·											
\211			: .			:			*	*• *					• • • •	
			icial	Seq	uenc	e										
	•			•			•		*							
<220						•							•			
\ 223) DE	scri	ptic	n of	Art	ITIC	121	Sequ	ence	:For	ward	pri	mer	1		
<400	> 7			-			. :·							•	•	
aaaa	tcta	iga c	gcga	tggc	g aa	cgcg	agcg	a				٠.				31
•										* .		• .				
<210	8 <				•					•						
<211										- -,				٠:		*
<212			*		٠. ٠.											•
<213	> Ar	tifi	cial	Seq	uenc	e	•									
(220	` `															•
,	•	scri	ptio	n of	Art	ific	ial	Seau	елсе	rev	erse	nri	Mer			
		,							000			ρι.				
(400													•	•.		
aaaa	tcta	ga g	teta	tgtg	g cg	gggc	ctcc	C								31
	••						· ·									•
(210)	> 9							•								
(211)																
(212)				_						:			. •			
(213,	> Ar	tifi	cial	Seq	uenc	е				•	٠.	.*				
(220)	>															٠.
		scri	ptio	n of	Art	ific	ial	Sequ	ence	:For	ward	pri	mer	•	t. 	• .
(400)	> 9									٠,	•			•		
aaaa	tcta	ga t	ctat	ggcg	a ac	tata	gcca	tgc	a						*	34

<211> 35 <212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
⟨220⟩	
<223> Description of Artificial Sequence:reverse primer	
⟨400⟩ 10 aaaatctaga aaggctaaag atttacagat gctcc 35	
〈210〉11 〈211〉33	
<pre><212> DNA <213> Artificial Sequence</pre>	
<220>	
(223) Description of Artificial Sequence: Forward primer	
⟨400⟩ 11	
aaaatctaga gtatggccaa cactaccgga gag	
⟨210⟩ 12	
<211> 31 <212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<pre><220> <223> Description of Artificial Sequence:reverse primer</pre>	
⟨400⟩ 12	3
aaaatctaga cctgtctgcc taccagcctg c	
⟨210⟩ 13	
<211> 36 <212> DNA	
√213 Artificial Sequence	ia.
⟨220⟩ ⟨221⟩	
<pre><223> Description of Artificial Sequence:FLAG epitope</pre> <400> 13	24.75
atggactaca aggacgacga tgacaagggg atcctg 36	.:
<210> 14 <211> 12	•
<pre><212> PRT <213> Artificial Sequence</pre>	••
⟨220⟩	
<pre><223> Description of Artificial Sequence:FLAG epitope</pre>	
<400> 14	

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp	Lys Gly lle Leu
.	10
(0.0)	
<210> 15	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
⟨220⟩	
(223) Description of Artificial	Converse Forward aring
72237 Description of Artificial	Sequence.Forward primer
<400> 15	
aaaatctaga cggcgatggc gaacgctag	rt ga 32
	0. 5.
<210> 16	
⟨211⟩ 33	
<212> DNA	
<pre><213> Artificial Sequence</pre>	
<220>	
<223 Description of Artificial	Sequence:reverse primer
(100)	
<400> 16	
aaaatctaga cactttgaga gtcttgtga	a ggc 33
⟨210⟩ 17	
<211> 33	
<212> DNA	
(213) Artificial Sequence	
(2.0) /// (1.1) ocquerios	
⟨220⟩	
<223> Description of Artificial	Sequence:Forward primer
<400> 17	
aaaatctaga tctatggcga actatagcca	a tgc 33
(a.a)	
(210) 18	
(211) 35	
(212) DNA	
<213> Artificial Sequence	
⟨220⟩	
<pre><223> Description of Artificial</pre>	Sequence: Forward primer
VILLOY DESCRIPTION OF ALCHICIAN	Sequence. roswaru primer
<400> 18	
aaaatctaga aaggctaaag atttacagal	t gctcc 35
<210> 19	
⟨211⟩ 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
• .	

<220 <223		.	inti	on o	f Ar	tifi	cial	San	UARC	A * F O	VATE	A D.	imor			
<400		• • •			' 1 - Λ 1 -	.,,,	CIAI	Jey	06110	5.15	AE12	e pi	11861			
aaaa	-		caaa	tact	ga a	ctgg	ccga	t-cc	CC.		,	· 		-		34
/010	·\ ~^											ر اساح د				
<210 <211	> 3	4			•											
<212 <213			icia	l Se	quen	ce										
<220	-							7.								
<223)> D	escr	ipti	on o	f Ar	tifi	cial	Seq	uenc	e:re	vers	e pr	imer			
<400 aaaa			tgtt	ggcc	CC A	gtat	ggtg	a tc	a t							34
<210 <211	•		19 *													
<212 <213	> D	NA														
<220			a ah	•								***	37.			
<221	> C						- 1									
<222 <223																
<400	•					1. j.										
atg Met	gcg Ala	aac Asn	gct Ala	agt Ser	gag Glu	ccg Pro	ggc Gly	ggc Gly	ggc Gly	ggc Gly	ggc Gly	ggg Gly	gcc Ala	gag Glu	gct Ala	48
. 1				5				ar Veril	10					15		
gcc Ala	gcg Ala	ctg	ggc Gly	ctc Leu	agg Arg	ctg	gcc Ala	aca Thr	ctc Leu	agc Ser	ctg	ctg	ctg Leu	tgc Cvs	gtg Val	96
			20					25					30			
agc Ser	c tg Leu	gcg Ala	ggc Glv	aac, Asn	gtg	ctg	ttc	gct	ctg	ctc	atc	gtg	agg	gag	CgC	144
ॅ इ .		35				. 5	40	ATE.		Leu	116	45	NIE		AI E	
agc	ctg	cac	CgC	gcg	cct	tac	tac	ctg	ctg	ctc	gac	ctg	tgc	ctg	gcc	192
Ser	50	1112	MIR	Ala	r i u	55	ıyr	Leu	Leu	Leu	ASP 60	Leu	Lys	ren	Ala	
gac	ggg	ctg	cgc	gcg	ctc	gcc	tgt	ctc	ccg	gcc	gtc	atg	ctg	gct	gcg	240
Asp 65	Gly	Leu	Arg	Ala	Leu 70	Ala	Cys	Leu	Pro	Ala 75	Val	Met	Leu	Ala	Ala 80	
cgg	¢g¢_	gcg	gca	gcc	gcg	gcg	ggg	acg	cct	ccg	ggt	gcg	ctg	ggc	tgc	288
Arg	Arg	Ala	Ala	Ala 85	Ala	Ala	Gly	Thr	Pro 90	Pro	Gly	Ala	Leu	Gly 95	Cys	
				A 1 A					• • •				•			

Ly	s Lei	ı Lei	100		Leu	Ala	a Ala	Leu 105		Cys	Phe	His	110		Phe	
c t s Le i	g ctg I Lei	g ctg Leu 115	Gly	gtg Val	ggc Gly	gto	acc Thr 120	Arg	tac Tyr	ctg Leu	gcc	at o e 125	Ala	cac His	cac His	384
cgc Arg	t t t c 7 Ph e 130	: Tyr	gco Ala	gag Glu	Arg	ctg Leu 135	Ala	ggc Gly	tgg Trp	ccg Pro	tgc Cys 140	Ala	gcg Ala	atg Met	ctg Leu	432
gtg Val 145	Cys	gcc	gcc Ala	tgg Trp	gcg Ala 150	Leu	gct	t t g Leu	Ala	gcg Ala 155	Ala	ttc Phe	ccg Pro	ccg Pro	gtg Val 160	480
c t g Leu	gac Asp	ggc Gly	ggt Gly	ggc Gly 165	gcg Ala	gac Asp	gac Asp	gag Glu	gat Asp 170	Ala	ccg Pro	tgc Cys	gcc Ala	ctg Leu 175	gag Glu	528
cag Gln	cgg Arg	ccc Pro	gac Asp 180	ggc Gly	gcc Ala	ccg Pro	ggt Gly	gcg Ala 185	cta Leu	ggc Gly	ttc Phe	ctg Leu	ctg Leu 190	ctc Leu	ctg Leu	576
gcc Ala	gcg Ala	gtg Val 195	gtg Val	ggc Gly	gcc Ala	acg Thr	cac His 200	ctc Leu	gtc Val	tac Tyr	ctt Leu	cgc Arg 205	ctg Leu	ctc Leu	ttc Phe	624
ttc Phe	atc lie 210	His	gac Asp	cgc Arg	cgc Arg	aag Lys 215	atg Met	cgg Arg	ccc Pro	gca Ala	cgc Arg 220	ctg Leu	gtg Val	ccc Pro	gcc Ala	672
gtc Val 225	Ser	cac His	gac Asp	tgg Trp	acc Thr 230	ttc Phe	cac His	ggc Gly	ccg Pro	ggc Gly 235	gcc Ala	acc Thr	ggt Gly	caa Gin	gcg Ala 240	720
gcc Ala	gcc Ala	aac Asn	Trp	acg Thr 245	gcg Ala	ggc Gly	ttc Phe	ggc Gly	cgc Arg 250	ggg Gly	ccc Pro	acg Thr	cca Pro	cct Pro 255	gcg Ala	768
ctc Leu	gtg Val	ggc Gly	atc ile 260	agg Arg	cct Pro	gca Ala	ggc Gly	ccg Pro 265	ggc Gly	cgc Arg	gga Gly	gcc Ala	cgg Arg 270	cgc Arg	ctc Leu	816
ctg Leu	gtg Val	ctg Leu 275	gag Glu	gaa Glu	ttc Phe	aag Lys	acg Thr 280	gag Glu	aag Lys	agg Arg	ctg Leu	tgc Cys 285	aag Lys	atg Met	ttc Phe	864
tac Tyr.	gcc Ala 290	atc lle	acg Thr	ctg Leu	Leu	ttc Phe 295	ctg Leu	ctc Leu	ctc Leu	tgg Trp	ggg Gly 300	ccc Pro	tat Tyr	gtg Val	gtt Val	912
gcc Ala 305	agt Ser	tac Tyr	ctg Leu	cgc Arg	gtc Val 310	Leu	gtg Vai	cgg Arg	ccc Pro	gga Gly 315	gct Ala	gtc Val	ccg Pro	cag Gln	gcc Ala 320	960
tac	ctg	aca	gcc	tcg	gtg	tgg	ctg	aca	ttc	gca	cag	gcc	ggc	atc	aac	1008

1134

16/24

Tyr Leu Thr Ala Ser Val Trp Leu Thr Phe Ala Gin Ala Giy ile Asn ccc gtg gtg tgt ttc ctc ttc aac cgg gag ctg agg gac tgt ttc aga Pro Val Val Cys Phe Leu Phe Asn Arg Glu Leu Arg Asp Cys Phe Arg gee eag tte eec tgt tge eag age eec eag gee acg eag gee acc etc. 1104 Ala Gin Phe Pro Cys Cys Gin Ser Pro Gin Ala Thr Gin Ala Thr Leu ccc tgc gac ctg aaa ggc att ggt ttg tga Pro Cys Asp Leu Lys Gly lie Gly Leu <210> 22 <211> 377 <212> PRT (213) Rattus sp. **<400> 22** Met Ala Asn Ala Ser Glu Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu Ala Ala Ala Leu Giy Leu Arg Leu Ala Thr Leu Ser Leu Leu Cys Val Ser Leu Ala Gly Asn Val Leu Phe Ala Leu Leu lle Val Arg Glu Arg Ser Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Leu Leu Leu Asp Leu Cys Leu Ala Asp Gly Leu Arg Ala Leu Ala Cys Leu Pro Ala Val Met Leu Ala Ala-Arg Arg Ala Ala Ala Ala Gly Thr Pro Pro Gly Ala Leu Gly Cys Lys Leu Leu Ala Phe Leu Ala Ala Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe 100 105 Leu Leu Gly Val Gly Val Thr Arg Tyr Leu Ala lle Ala His His Arg Phe Tyr Ala Glu Ar~ Leu Ala Gly Trp Pro Cys Ala Ala Met Leu Val Cys Ala Ala Trp Ala Leu Ala Leu Ala Ala Ala Phe Pro Pro Val 150 Leu Asp Gly Gly Ala Asp Asp Glu Asp Ala Pro Cys Ala Leu Glu . . 170 . .

Gin Arg Pro Asp Gly Ala Pro Gly Ala Leu Gly Phe Leu Leu Leu Leu

17/24 180 185 190 Ala Ala Val Val Gly Ala Thr His Leu Val Tyr Leu Arg Leu Leu Phe 200 Phe lle His Asp Arg Arg Lys Met Arg Pro Ala Arg Leu Val Pro Ala 210 Val Ser His Asp Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Thr Gly Gln Ala 230 235 Ala Ala Asn Trp Thr Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Ala 250 Leu Val Gly lle Arg Pro Ala Gly Pro Gly Arg Gly Ala Arg Arg Leu 265 Leu Val Leu Glu Glu Phe Lys Thr Glu Lys Arg Leu Cys Lys Met Phe **275** ... 280 Tyr Ala lle Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Gly Pro Tyr Val Val Ala Ser Tyr Leu Arg Val Leu Val Arg Pro Gly Ala Val Pro Gln Ala 310. 315 Tyr Leu Thr Ala Ser Val Trp Leu Thr Phe Ala Gin Ala Gly lie Asn 325 Pro Val Val Cys Phe Leu Phe Asn Arg Glu Leu Arg Asp Cys Phe Arg 340 Ala Gin Phe Pro Cys Cys Gin Ser Pro Gin Ala Thr Gin Ala Thr Leu 360 Pro Cys Asp Leu Lys Gly Ile Gly Leu 370 <210> 23 <211> 1113 <212> DNA <213 Rattus sp. <220> <221> CDS **<222> (1).. (1110)** <223> Rat SREB2 **<400> 23** atg gcg aac tat agc cat gca gct gac aac att ttg caa aat ctc tcg 48 Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn Ile Leu Gln Asn Leu Ser 10

Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe IIe IIe Gly

2	0	25	30	
gtc agt gtg gt Val Ser Val Va 35	g ggc aac ctt I Gly Asn Leu	ctg atc tcc att Leu lle Ser lle 40	ttg cta gtg aaa gat Leu Leu Val Lys Asp 45	144
aag acc tig ca Lys Thr Leu Hi 50	t aga_gct_cct s Arg Ala Pro 55	tac tac ttc_ctg Tyr Tyr Phe Leu	ctg gat_ctg_tgc_tgc_ Leu Asp Leu Cys Cys 60	192
tca gac atc cto Ser Asp lie Leo 65	c aga tct gca u Arg Ser Ala 70	att tgt ttt cca lle Cys Phe Pro 75	ttt gta ttc aac tct Phe Val Phe Asn Ser 80	240
gtc aaa aat gg Val Lys Asn Gi	c tot acc tgg y Ser Thr Trp 85	act tac ggg act Thr Tyr Gly Thr 90	ctg act tgc aaa gtg Leu Thr Cys Lys Val 95	288
att gcc ttt ctg lle Ala Phe Leg 100	ı Gly Val Leu :	tcc tgt ttc cac Ser Cys Phe His 105	act gcc ttc atg ctc Thr Ala Phe Met Leu 110	336
ttc tgc atc ago Phe Cys IIe Sei 115	r Val Thr Arg	tac tta gcc atc Fyr Leu Ala IIe 120	gcc cat cac cgc ttc Ala His His Arg Phe 125	384
tat aca aag agg Tyr Thr Lys Arg 130	ctg acc ttt Leu Thr Phe 1 135	tgg acg tgt ttg Irp Thr Cys Leu	gct gtg atc tgc atg Ala Val lle Cys Met 140	432
gtg tgg act ctg Val Trp Thr Leu 145	tct gtg gcc a Ser Val Ala M 150	atg gca ttt ccc Met Ala Phe Pro 155	cca gtt tta gat gta Pro Val Leu Asp Val 160	480
ggc acc tac tca Gly Thr Tyr Ser	ttc att agg g Phe lie Arg (165	gag gag gat cag ilu Glu Asp Gln 170	tgt acc ttc caa cac Cys Thr Phe GIn His 175	528
cgc tcc ttc agg	Ala Asn Asp S	cc cta gga ttt er Leu Gly Phe 185	atg ctg ctc ctt gct Met Leu Leu Leu Ala 190	576
ctc atc ctc cta Leu lle Leu Leu 195	Ala Thr Gin L	tt gtc tac ctc eu Val Tyr Leu 00	aag ctg ata ttt ttt Lys Leu ile Phe Phe 205	624
gtc cac gat cga Val His Asp Arg 210	agg aaa atg a Arg Lys Met L 215	ys Pro Val Gln	ttt gta gca gca gtg Phe Val Ala Ala Val 220	672
agt cag aac tgg Ser Gin Asn Trp 225	acc ttt cat g Thr Phe His G 230	gc cct gga gct ly Pro Gly Ala 235	agt ggc cag gca gct Ser Gly Gin Ala Ala 240	720
gcc aat tgg cta Ala Asn Trp Leu	gca gga ttt g Ala Gly Phe G	ga agg ggt ccc ly Arg Gly Pro	aca cca ccc acc ttg Thr Pro Pro Thr Leu	768

												٠.		•		
				24	5				250)				255	5	
c t g Le i	g gg u Gl	c at	c agg e Arg 260	g Gli	a aal n Asr	gcg	aat Asn	acc Thr 265	Thr	ggc	aga Arg	aga Arg	cgg Arg 270	Let	ttg Leu	81
gt (t ttį	g ga	t gag	g tto	aaa	atg	gag	aaa	aga	atc	agc	aga	atg	tto	tat Tyr	864
		27	5		. Lys	met	280		AIR	. 116	351	285		rne	: i y r	
a ta I I e	atg Met 290	Thi	t tto r Phe	cto Leu	ttc Phe	cta Leu 295	Thr	ttg Leu	tgg Trp	ggt Gly	ccc Pro 300	Tyr	ctg Leu	gtg Val	gcc Ala	912
tgc Cys 305	Tyr	tgg Trp	g aga Arg	gtt Val	ttt Phe 310	Ala	aga Arg	ggg Gly	cct Pro	gta Val 315	Val	cca Pro	ggg Giy	gga Gly	ttt Phe 320	960
cta Leu	a ca Thr	gco Ala	gct Ala	gtc Val 325	Trp	atg Met	agt Ser	ttc Phe	gcc Ala 330	caa Gin	gca Ala	gga Gly	atc lie	aat Asn 335	ccc Pro	100
ttt Phe	gtc Val	t g c Cys	att lle 340	Phe	tcc Ser	aac Asn	agg Arg	gag Glu 345	ctg Leu	agg Arg	cgc Arg	tgt Cys	ttc Phe 350	agc Ser	aca Thr	105
acc Thr	ctt Leu	ctt Leu 355	tac Tyr	tgc Cys	aga Arg	aaa Lys	tcc Ser 360	agg Arg	tta Leu	cca Pro	agg Arg	gaa Glu 365	cct Pro	tac Tyr	tgt Cys	110
	ata lle 370					•					#i	.•		-		111
			ı	. 3					•					· .		
<21 <21	0> 2 1> 3 2> P	70 RT		•		•		•	•	,			·.			
			s sp	•							; .		٠			
	D> 2 Ala		Tyr	Ser 5	His	Ala	Ala	Asp	Asn 10		Leu :	GIn	Asn	Leu 15	Ser	
Pro	Leu	Thr	Ala 20	Phe	Leu	Lys	Leu	Thr 25	Ser	Leu	Gly	Phe	11e 30	lle	Gly	,
/al	Ser	Val 35	Val	Gly	Asn	Leu	Leu 40	He	Ser	lle	Leu	Leu 45	Val	Lys	Asp	
_ys	Thr 50	Leu	His	Arg	Ala	Pro 55	Tyr	Tyr	Phe	Leu	Leu 60	Asp	Leu	Cys	Cys	
er 65	Asp	He	Leu	Arg	Ser 70	Ala	lle	Cys	Phe	Pro	Phe	Val	Phe	Asn	Ser	

Val lie 370

20/24

Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val lle Ala Phe Leu Gly Val Leu Ser Cys Phe His Thr Ala Phe Met Leu 100 Phe-Cys lie Ser Val Thr Arg Tyr Leu Ala IIe Ala His His Arg Phe Tyr Thr Lys Arg Leu Thr Phe Trp Thr Cys Leu Ala Val lle Cys Met Val Trp Thr Leu Ser Val Ala Met Ala Phe Pro Pro Val Leu Asp Val Gly Thr Tyr Ser Phe lle Arg Glu Glu Asp Gln Cys Thr Phe Gln His 165 Arg Ser Phe Arg Ala Asn Asp Ser Leu Gly Phe Met Leu Leu Leu Ala Leu lle Leu Leu Ala Thr Gln Leu Val Tyr Leu Lys Leu lle Phe Phe Val His Asp Arg Arg Lys Met Lys Pro Val Gin Phe Val Ala Ala Val Ser Gin Asn Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gin Ala Ala Ala Asn Tro Leu Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Thr Leu Leu Gly lle Arg Gln Asn Ala Asn Thr Thr Gly Arg Arg Arg Leu Leu Val Leu Asp Glu Phe Lys Met Glu Lys Arg lie Ser Arg Met Phe Tyr 275 280 lle Met Thr Phe Leu Phe Leu Thr Leu Trp Gly Pro Tyr Leu Val Ala .1. Cys Tyr Trp Arg Val Phe Ala Arg Gly Pro Val Val Pro Gly Gly Phe 310 Leu Thr Ala Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gln Ala Gly Ile Asn Pro Phe Val Cys lle Phe Ser Asn Arg Glu Leu Arg Arg Cys Phe Ser Thr 340 Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Lys Ser Arg Leu Pro Arg Glu Pro Tyr Cys

•			•	- 4						4		, .				
<21	0> 2	25		.*		**		· .					+ + 4,			
<21	1> 1	1122		٠		•		A								* * #
	2> [• •		•		• • • •				
<21	3> F	≀at c	oron	avir	us			•				· .		•	•,•	-
					• .						.···		. · · .			
<22	•			4.*			٠							** *		
	1> 0					,		,		rus en ent	` : <u>.</u>		• .			
			(111		•	1 : .				* * * * * * * * * * * * * * * * * * *	**	· .				
<22	3> R	lat S	REB3				S. **:				<u>, i, /u>					
														4.		
	0> 2		_,*.	*		*		٠.						* **		
atg	gcc	aac	acc	acc	gga	gag	CCC	gaa	gag	gtg	agc	ggc	gca	ctg	tcc	48
me t	АГа	. ASn	Line			GIU	Pro	GIU	GIU	vai	Ser	Gly	Ala	Leu	Ser	
				- 5					10		,		• .	15	*.	
cta	cca	tra	gra	tca	act		~ t ~	220	cta	~ + ~				ċtġ		06
Len	Pro	Ser	Ala	Ser	βUL Ala	Tvr	Val	lve	الما	RIR	LIE	Lig	CLU	Leu	alc	96
		, 001/	20		714			25	Leu		Leu	Leu	30	Leu	115	
		•								21.0		. · · .		,	·	
atg	tgt	gta	agc	ctg	gca	ggc	aat	BCC	atc	ttg	tcc	cte	cte	øtø	ctc	144
Met	Cys	Val	Ser	Leu	Ala	Gly	Asn	Ala	He	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Leu	
		35					40	*, ' -			;	45			777.	
		*. • •				2						,				
aag	gag	cgt	gcc	ctg	cac	aag	gct	cct	tạc	tac	ittt	ctg	ctg	gac	ctg	192
Lys	Glu	Arg	Ala	Leu	His	Lys	Ala	Pro	Tyr	Tyr	Phe	Leu	Leu	Asp	Leu	
	50					55	• • •				60					
					• '	1.2+	· · · ·			٠						
tgc	cta	gcc	gat	ggc	ata	cgc	tct	gcc	atc	tgc	ttc	CCC	ttt	gta	ctg	240
	Leu	Ala	Asp	Gly		Arg	Ser	Ala	He		Phe	Pro	Phe	Val		
65				<i>'</i> -	70					75				· . · . · . · . · . · . · . · . · . · .	80	
		# 1 to									4.				4 - 27	
gct	101	gig	CgC	cat	ggc	100	tcg	tgg	acc	ttc	agt	gca	ctc	agc	tgt	288
AIA	. ser	Val	Arg			ser	Ser.	irp	Inr	Pne	Ser	Ala	Leu	Ser	Cys	
		•		85					90	: .				95		
220	a † †	ata	acc		210	~~ t	***	-+-				1		gcc		226
lvs	lle	Val	Ala	Phe	Mat	Ala	Val	Lán	Pho	Cve	Dha	Uic	RCR	Ala	LIG Dha -	336
-,,		•••	100	1 110	mc t	AIA	741	105	1 116	Cys	1 116	111.2	110	nia	LHE	
	100					4	* ***	100			•	•.	110			
atg	ctg	ttc	téc	atc	age	øtc	acc	ĊŻG	tac	ato	PCC	atc	grr.	cac	cac	384
Met	Leu	Phe	Cvs	He	Ser	Val	Thr	Arg	Tyr	Met	Ala	lle	Ala	His	His	004
		115					120					125				
				• • .					-	,				• '		
cgc	.ttc	tat	gcc	aag	cgc	atg	aca	ctc	tgg	aca	tgc	gca	gct	gtc	atc	432
Arg	Phe	Tyr	Ala	Lys	Arg	Met	Thr	Leu	Trp	Thr	Cys	Ala	Ala	Val	He	• -
	130					135			•		140		.*			
		•	.:					• •					•	1 .		•
tgc	atg	gcc	tgg	acç	ttg	tct	gtg	gcc	atg	gct	ttc	cca	cct	gtc	ttt	480
Cys	Met	Ala	Trp	Thr	Leu	Ser	Val	Ala	Met	Ala	Phe	Pro	Pro	Val	Phe	
145					150				٠,	155					160	
				,			*			·. :						
ga t	gtg	ggc	acc	tac	aag	ttt	atc	cga	gag	gag	gac	cag	tgc	atc	ttt .	528
Asp	Val	Gly	Thr	Tyr	Lys	Phe	He	Arg	Glu	Glu	Asp	Gln	Cys	He	Phe	
	٠٠.			165					170				•	175		

gag Glu	ca Hi	t cgo s Arg	tac Tyr 180	Phe	aaa Lys	gca Ala	aa i Asr	t gad 1 Asp 185	Thr	ctg Leú	g ggo I Gly	ttt Phe	atg Met 190	Leu	t atg ı Met	576
t t g Leu	Ala	t gtg a Val 195	Leu	atg Met	gca	Ala	Thr	His	Ala	Val	tat Tyr	Gly	Lys	ctg Leu	cta Leu	624
ctc Leu	Phe 210	e Glu	tat Tyr	cgt Arg	cac His	cgc Arg 215	Lys	atg Met	aag Lys	cca Pro	gtg Val 220	Gin	atg Met	gtg Val	r ccc Pro	672
gcc Ala 225	He	agc Ser	caa Gln	aac Asn	tgg Trp 230	Thr	t t c Phe	cat His	ggc Gly	cct Pro 235	Giy	gc t Ala	acc Thr	ggc Gly	cag Gin 240	720
gct Ala	gc t Ala	gcc	aac Asn	tgg Trp 245	ile	gct Ala	ggc Gly	ttt Phe	ggc Gly 250	cgt Arg	ggg Gly	ccc Pro	atg Met	cca Pro 255	cca Pro	768
act Thr	ctg Leu	ctg Leu	ggt Gly 260	atc	cgg Arg	cag Gin	aat Asn	ggg Gly 265	His	gca Ala	gct Ala	agc Ser	cgg Arg 270	cgg Arg	cta Leu	816
ctg Leu	ggc Gly	atg Met 275	gac Asp	gag Glu	gtc Vai	aag Lys	ggt Gly 280	Glu	aag Lys	cag Gln	ctg Leu	ggc Gly 285	cga Arg	atg Met	t t c Phe	864
tac Tyr	gcg Ala 290	lle	aca Thr	ctg Leu	ctc Leu	ttc Phe 295	ctg Leu	ctc Leu	ctc Leu	tgg Trp	tca Ser 300	cca Pro	tac Tyr	att	gtg Val	912
gcc Ala 305	tgc Cys	tac Tyr	tgg Trp	cga Arg	gtg Val 310	ttt Phe	gtg Val	aaa Lys	gcc Ala	tgc Cys 315	gc t Ala	gtg Val	ccc Pro	cac His	cgc Arg 320	960
tac Tyr	ctg Leu	gcc Ala	act Thr	gct Ala 325	gtt Val	tgg Trp	atg Met	agc Ser	ttc Phe 330	gcc Ala	cag GIn	gc t Ala	gct Ala	gtc Val 335	aac Asn	1008
cca Pro	atc	gtc Val	tgc Cys 340	ttc Phe	ctg Leu	ctt Leu	aac Asn	aag Lys 345	gac Asp	ctc Leu	aag Lys	aag Lys	tgc Cys 350	Leu	agg Arg	1056
act Thr	cat His	gcc Ala 355	cct Pro	tgc Cys	tgg Trp	ggc Gly	aca Thr 360	gga Gly	ggt Giy	gcc Ala	cca Pro	gct Ala 365	ccc Pro	aga Arg	gaa Glu	1104
		tgt Cys			tga			in the second								1122

<212> PRT
<213> Rat coronavirus

<400> 26

Met Ala Asn Thr Thr Gly Glu Pro Glu Glu Val Ser Gly Ala Leu Ser 1 5 10 15

Leu Pro Ser Ala Ser Ala Tyr Val Lys Leu Val Leu Leu Gly Leu lle 20 25 30

Met Cys Val Ser Leu Ala Gly Asn Ala IIe Leu Ser Leu Leu Val Leu 35 40 45

Lys Glu Arg Ala Leu His Lys Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu 50 55 60

Cys Leu Ala Asp Gly lle Arg Ser Ala lle Cys Phe Pro Phe Val Leu 65 70 75 80

Ala Ser Val Arg His Gly Ser Ser Trp Thr Phe Ser Ala Leu Ser Cys 85 90 95

Lys lie Val Ala Phe Met Ala Val Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe 100 105 110

Met Leu Phe Cys IIe Ser Val Thr Arg Tyr Met Ala IIe Ala His His 115 120 125

Arg Phe Tyr Ala Lys Arg Met Thr Leu Trp Thr Cys Ala Ala Val lle 130 135 140

Cys Met Ala Trp Thr Leu Ser Val Ala Met Ala Phe Pro Pro Val Phe 145 150 155 160

Asp Val Gly Thr Tyr Lys Phe lle Arg Glu Glu Asp Gln Cys lle Phe 165 170 175

Glu His Arg Tyr Phe Lys Ala Asn Asp Thr Leu Gly Phe Met Leu Met 180 185 190

Leu Ala Val Leu Met Ala Ala Thr His Ala Val Tyr Gly Lys Leu Leu 195 200 205

Leu Phe Glu Tyr Arg His Arg Lys Met Lys Pro Val Gln Met Val Pro 210 215 220

Ala lle Ser Gln Asn Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Thr Gly Gln 225 230 235 240

Ala Ala Ala Asn Trp lie Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Met Pro Pro 245 250 255

Thr Leu Leu Gly Ile Arg Gln Asn Gly His Ala Ala Ser Arg Arg Leu 260 265 270

Leu Gly Met Asp Glu Val Lys Gly Glu Lys Gin Leu Gly Arg Met Phe

WO 99/46378 PCT/JP99/01191

24/24

275 280

285

Tyr Ala lie Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Ser Pro Tyr lie Val 290 295 300

Ala Cys Tyr Tro Arg Val Phe Val Lys Ala Cys Ala Val Pro His Arg 305 310 315

Tyr Leu Ala Thr Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gin Ala Ala Val Asn 325 330 335

Pro 11e Val Cys Phe Leu Leu Asn Lys Asp Leu Lys Lys Cys Leu Arg 340 345 350

Thr His Ala Pro Cys Trp Gly Thr Gly Gly Ala Pro Ala Pro Arg Glu 355 360 365

Pro Tyr Cys Val Met

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01191

	SSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/12, C07K14/705, C	12P21/02, C07K16/28	
According	to International Patent Classification (IPC) or to both	national classification and IPC	
B. FIELD	DS SEARCHED		
Int	documentation searched (classification system follows . C1 ⁶ C12N15/12, C07K14/705, C	112P21/02, C07K16/28	
Documenta	ation searched other than minimum documentation to t	the extent that such documents are include	d in the fields searched
Electronic o	data base consulted during the international search (na bank/EMBL/DDBJ/GeneSeq	ame of data base and, where practicable, so	earch terms used)
C. DOCU	JMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where a		Relevant to claim No.
A	US, 5508384, A (Univ. New Y 16 April, 1996 (16. 04. 96)	(ramily: none)	1-8
A	The Journal of Neruoscience Guoping Feng et al., "Cloning characterization of a novel	ng and functional Dopamine receptor from	1-8
	Drosophila melanogaster" p.3	3925-3933	
A	FEBS Letters Vol. 355 No. 3 Stephen Rees et al., "Clonin of the human 5-HTsa serotonia	ng and characterisation	1-8
<u> </u>	er documents are listed in the continuation of Box C.	See patent family annex.	
"A" documer considere earlier d' documer cited to special r "O" documer means documer the prior	categories of cited documents: ent defining the general state of the art which is not red to be of particular relevance document but published on or after the international filing date ent which may throw doubts on priority claim(s) or which is establish the publication date of another citation or other reason (as specified) ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or other ent published prior to the international filing date but later than writy date claimed	"Y" considered novel or cannot be considered when the document is taken alone document of particular relevance; the clai considered to involve an inventive step when the combined with one or more other such do	ion but cited to understand vention aimed invention cannot be d to involve an inventive step aimed invention cannot be when the document is ocuments, such combination art
15 Jı	actual completion of the international search une, 1999 (15. 06. 99)	Date of mailing of the international search 22 June, 1999 (22.	th report 06. 99)
	nailing address of the ISA/ nese Patent Office	Authorized officer	

発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl° C12N 15/12, C07K 14/705, C12P 21/02, C07K 16/28

調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl C12N 15/12, C07K 14/705, C12P 21/02, C07K 16/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連す	ると認められる文献	
引用文献の		
カテゴリー*	十一	関連する 請求の範囲の番号
A	US, 5508384, A (Univ. New York State) 16.4月.1996 (16.04.96) パテントファミリーなし	1-8
A	The Journal of Neruoscience Vol. 16 No. 12 (1996) Guoping Feng et al. "Cloning and functional characterization of a novel Dopamine receptor from Drosophila melanogaster" p. 3925-3933	1-8
Α	FEBS Letters Vol. 355 No. 3 (1994) Stephen Rees et al. "Cloning and characterisation of the hum an 5-HTs serotonin receptor" p. 242-246	1-8

C欄の続きにも文献が列挙されている。

□ パテントファミリーに関する別紙を参照。

引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す もの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日 以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行 日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する 文献 (理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

日本国特許庁 (ISA/JP)

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって て出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理 論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明 の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以 上の文献との、当業者にとって自明である組合せに よって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

国際調査機関の名称及びあて先

15.06.99

22.06.99

特許庁審査官(権限のある職員) 小暮 道明

国際調査報告の発送日

4 B 9358

郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 電話番号 03-3581-1101 内線 3448



Europäisches Patentamt Eur pean Pat nt Offic

Offic europé n des brevets

(11) EP 1 067 183 A1

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION

published in accordance with Art. 158(3) EPC

- (43) Date of publication: 10.01.2001 Bulletin 2001/02
- (21) Application number: 99939146.9
- (22) Date of filing: 11.03.1999

- (51) Int. Cl.7: **C12N 15/12**, C07K 14/705, C12P 21/02, C07K 16/28
- (86) International application number: PCT/JP99/01191
- (87) International publication number: WO 99/46378 (16.09.1999 Gazette 1999/37)
- (84) Designated Contracting States:

 AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU NL
 PT SE
- (30) Priority: 12.03.1998 JP 6024598 03.02.1999 JP 2677499
- (71) Applicant:
 YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.
 Tokyo 103 (JP)
- (72) Inventors:
 - MATSUMOTO, Mitsuyuki, Yamanouchi Pharm. Co.,Ltd.
 Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8585 (JP)

- SUGIMOTO, Toru,
 Yamanouchi Pharmaceuticai Co.,Ltd.
 Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8585 (JP)
- TAKASAKI, Jun, Yamanouchi Pharmaceutical Co.,Ltd. Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8585 (JP)
- SAITO, Tetsu,
 Yamanouchi Pharmaceutical Co.,Ltd.
 Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8585 (JP)
- KOBAYASHI, Masato,
 Yamanouchi Pharm. Co.,Ltd.
 Tokyo 174-8612 (JP)
- (74) Representative: HOFFMANN EITLE
 Patent- und Rechtsanwälte
 Arabellastrasse 4
 81925 München (DE)

(54) NOVEL G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEINS

(57) This invention belongs to the genetic engineering field, and provides novel G protein-coupled receptor family proteins SREB1, SREB2 and SREB3 expressed in the central nervous system, genes coding for said proteins, vectors containing said genes, host cells containing said vectors, processes for producing said G protein-coupled receptor proteins, screening methods using said G protein-coupled receptor proteins, antibodies for said G protein-coupled receptor proteins, and screening methods using said antibodies.

Representative method for obtaining the G proteincoupled receptor proteins of the present invention:

The reverse transcriptase-polymerase chain reaction (to be referred to as RT-PCR hereinafter) is used f r obtaining the G protein-coupled receptor proteins of the present invention. mRNA is extracted from human or rat brain tissue or brain-derived cells. Then, using the mRNA as the template and using two primers interposing the entire portion or a part of the G protein-coupled receptor protein translation region, RT-PCR is carried out to obtain cDNA corresponding to the G protein-coupled receptor protein or a part thereof. Then, the resulting cDNA of the novel C protein-coupled receptor

protein or a part thereof is ligated into an appropriate expression vector and expressed in a host cell to produce said G protein-coupled receptor protein.

D scripti n

Technical Field

This invention belongs to the genetic engineering field, and relates to novel G protein-coupled receptor proteins, genes coding for these G protein-coupled receptor proteins, methods for producing these G protein-coupled receptor proteins, screening methods using these G protein-coupled receptor proteins, antibodies for these G protein-coupled receptor proteins and screening methods using these antibodies.

10 Background Art

[0002] Cell membrane receptors which transmit signals to the intracellular region via the activation of heterotrimeric GTP binding protein are generally referred to as "G protein-coupled receptor". All members of the G protein-coupled receptor known to date are sometimes referred generally to as "seven transmembrane receptor", because they form a super family having a common structure which has the extracellular amino terminus and intracellular carboxyl terminus and passes through the cell membrane seven times. The G protein-coupled receptor transmits information on various physiologically active substances from cell membranes to the intracellular region via activation of heterotrimeric GTP binding protein and subsequent changes in the intracellular second messengers induced. As the intracellular second messengers which are controlled by the heterotrimeric GTP binding protein, cAMP via adenylate cyclase, Ca++ via phospholipase C and the like are well known, and it has been revealed recently that many cellular proteins are their targets, such as the control of channels and activation of protein kinases via the heterotrimeric GTP binding protein (Gudermann, T. et al. (1997), Annu. Rev. Neurosci., 20, 399 - 427). The physiologically active substances that transmit information via the G protein-coupled receptor include various known physiologically active substances such as neurotransmitters, hormones, chemokine, lipid-originated signal transducers, divalent ions and proteases. Information by these physiologically active substances is transmitted to the intracellular region through their specific G protein-coupled receptor, respectively.

[0003] Several hundred types of G protein-coupled receptor have so far been cloned from eucaryote. Regarding human, hundred or more types of G protein-coupled receptor for corresponding endogenous ligands have been cloned and are regarded as targets of drugs for diseases. There are various diseases in which G protein-coupled receptor is the target, and there exist effective drugs which act upon G protein-coupled receptor, in the respective fields of central nervous system, circulatory organ system, inflammatory immune system, digestive organ system, motor organ system and urinary organ/reproductive organ system (Stadel, J. et al. (1997), Trends Pharmacol. Sci., 18, 430 - 437). This indicates that agonists or antagonists of G protein-coupled receptor have a high possibility of becoming a therapeutic agent of diseases, so that studies are being actively carried out on the discovery and identification of new G protein-coupled receptors.

[0004] Cloning of G protein-coupled receptor genes tends to start based on their structural homology in the super family in many cases, and a receptor having no correspondence to endogenous ligand is referred to as "the orphan G protein-coupled receptor". In general, a ligand specific for the orphan G protein-coupled receptor has not been found, so that it was difficult to develop its agonist or antagonist. In recent years, however, it has been proposed to create a drug targeting for the orphan G protein-coupled receptor by combining the substantiated compound libraries and high performance high throughout screening (Stadel, J. et al. (1997), Trends Pharmacol. Sci., 18, 430 - 437).

[0005] That is, it is possible to screen an agonist for an orphan G protein-coupled receptor from a compound library by effective high throughput system of the measurement of cAMP and Ca⁺⁺ which are second messengers of many G protein-coupled receptors, or the measurement of GTPase activity and G protein binding of GTP_γS which are indexes of the activation of heterotrimeric GTP binding protein, so that it is possible to find specific agonists and antagonists making use of such compounds and furthermore to develop therapeutic drugs for certain diseases. Under such conditions, discovery of a novel G protein-coupled receptor capable of becoming a new therapeutic target of diseases is regarded as the most important step in creating a medicament which acts upon G protein-coupled receptors.

[0006] Among G protein-coupled receptors, there is a case in which a plurality of receptors are present for one endogenous ligand. Such receptors are referred to as receptor family, and each receptor is called subtype. Since all of the G protein-coupled receptors have a common structure which passes through the cell membrane s ven tim s, 20 to 25% of amino acids are preserved mainly in the transmembrane region even in mutually independent G protein-coupled receptors, but when they form a receptor family, ratio of the amino acids preserved among its subtypes significantly increases to 35% or more, particularly to 60 to 80% among subtypes having high relevancy (Strader, C.D. et al. (1994), Annu. Rev. Biochem., 63, 101 - 132).

[0007] When development of a therapeutic drug for diseases is planned by targeting for an endogenous ligand wherein a receptor family is present, specificity of its subtypes becomes important in many cases. This is because actions upon other subtype than actions upon a subtype that mediates the main action of a drug lead to side effects in

many cases. Accordingly, it is desirable to create a subtype-specific agonist or antagonist, but it is necessary to find a means for detecting the subtype-specificity for that purpose. Currently, a method for constructing a system in which a gene of a subtype is cloned and its specificity is detected using a cultured cell line or the like which expresses the gene is generally used.

[0008] When a novel G protein-coupled receptor is used as the target of disease treatment, it is highly possible that the subtype-specificity is important, so that discovery of a receptor family is important also in the case of the novel G protein-coupled receptor. The homology of amino acid sequences among independent G protein-coupled receptors is 20 to 25% as a whole, but when they form a receptor family, the homology significantly increases in general in the family, so that it is possible to presume whether they form a family or not, by comparing homology between two G protein-coupled receptors. It is possible to find novel G protein-coupled receptors which form a family, making use of such a means, and when a novel G protein-coupled receptor family is discovered, it will open a way for developing a drug for disease therapy because of the possibility of creating a subtype-specific agonist or antagonist.

[0009] The central nervous system transmits and controls various kinds of information using physiologically active substances represented by neurotransmitters. The G protein-coupled receptor is taking an important role in the signal transduction and control. Since many types of G protein-coupled receptor are present in the central nervous system, they are used as important therapeutic targets for diseases of the central nervous system. For example, it is considered that the G protein-coupled receptor of a neurotransmitter, dopamine, is a therapeutic target of schizophrenia (Seeman, P. et al. (1997), Neuropsychopharmacology, 16, 93 - 110), the G protein-coupled receptor of serotonin is that of depression (Cowen, P.J. (1991), Br. J. Psychiatry, 159 (Suppl. 12), 7 - 14), and the G protein-coupled receptor of neuro-peptide Y is that of eating disorder (Blomqvist, A.G. and Herzog, H. (1997), Trends Neurosci., 20, 294 - 298).

[0010] It is considered that a novel G protein-coupled receptor expressing in the central nervous system, preferably a human receptor, will lead to a candidate for a new therapeutic target of central nervous system diseases or to the elucidation of central nervous system functions. In addition, for the purpose of developing a subtype-specific drug, it is desirable also to find a family in the case of the novel G protein-coupled receptor expressing in the central nervous system. Though the gene of a receptor GPR27 obtained from a mouse, having high homology with the amino acid sequence of SREB1 which is one of the G protein-coupled receptors of the invention, and an amino acid sequence based on its gene sequence have been reported (O'Dowd, B.F. et al. (1998), Genomics, 47, 310 - 313), no information is available to date concerning gene sequence and amino acid sequence of a human receptor.

30 Disclosure of the Invention

50

55

[0011] The present invention is to provide novel G protein-coupled receptor family proteins expressed in the central nervous system, as the target of therapeutic agents for central nervous system diseases.

[0012] With the aim of achieving the above object, the present inventors have conducted intensive studies and, as a result, succeeded in isolating genes (SREB1, SREB2, SREB3, rSREB1, rSREB2 and rSREB3) which encode nov I G protein-coupled receptor family proteins expressed in the central nervous system.

[0013] Also, we have established vectors containing these genes, host cells containing these vectors and methods for producing these G protein-coupled receptor proteins using such host cells, and rendered possible screening of these G protein-coupled receptor proteins and compounds, peptides and antibodies capable of modifying activities of the G protein-coupled receptor proteins.

[0014] Illustratively, the present invention relates to

(1) a G protein-coupled receptor protein which has the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4, 6, 22 or 26, or a G protein-coupled receptor protein as an equivalent to the protein,

preferably a human origin G protein-coupled receptor protein which has the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4 or 6 or a G protein-coupled receptor protein as an equivalent to the protein, or a rat origin G protein-coupled receptor protein which has the amino acid sequence described in Sequence No. 6, 22 or 26 or a G protein-coupled receptor protein as an equivalent to the protein,

- (2) a G protein-coupled receptor protein which has the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4, 6, 22 or 26.
- (3) a gene which has a nucleotide sequence coding for the G protein-coupled receptor protein described in the item (1),
- (4) a vector which contains the gene described in the item (3).
- (5) a host cell which contains the vector described in the item (4).
- (6) a method for producing the G protein-coupled receptor protein described in the item (1) or (2), or a G protein-coupled receptor protein as an equivalent to the protein, which comprises using the host cell described in the item (5),
- (7) a method for screening a medicament acting on the G protein-coupled receptor protein described in the item (1)

- or (2), which comprises allowing the G protein-coupled receptor protein to contact with a compound to be tested, or (8) an antibody for the G protein-coupled receptor protein described in the item (1) or (2) or a partial peptide thereof.
- [0015] The following explains the terms to be used herein.
- [0016] The term "human origin" or "rat origin" means an amino acid sequence identical to the amino acid sequence of a G protein-coupled receptor protein expressing in human or rat.
- [0017] The term "equivalent" of the G protein-coupled receptor protein of the present invention means a G protein-coupled receptor protein which is expressed in the central nervous system and shows the same activity of any one of the G protein-coupled receptor proteins represented by the amino acid sequences described in Sequence No. 2, 4, 6, 22 or 26.
 - [0018] In this connection, the G protein-coupled receptor and the G protein-coupled receptor protein have the same meaning.
- [0019] The novel G protein-coupled receptor protein of the present invention is any one of the G protein-coupled receptor proteins represented by the amino acid sequences described in Sequence No. 2, 4, 6, 22 and 26, or equivalents thereof. Illustratively, all of G protein-coupled receptor proteins are included in the invention as long as they have the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4, 6, 22 or 26, or an amino acid sequence in which the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4, 6, 22 or 26, has substitution, deletion or insertion of one or a plurality, preferably from 1 to 10, more preferably from 1 to 7, most preferably from 1 to 5, of amino acids, and have the same activity of the protein represented by the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4 or 6. Preferably, it is a human or rat origin G protein-coupled receptor protein having the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4, 6, 22 or 26.
- [0020] Also, the gene which has a nucleotide sequence coding for the novel G protein-coupled receptor protein of the invention may be any gene, as long as it has a nucleotide sequence coding for the G protein-coupled receptor protein represented by the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4 or 6, or an equivalent thereof. Preferably, it is a gene which has a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4, 6, 22 or 26. More preferably, it is a gene which has a sequence of from 1 to 1,125 positions of the nucleotide sequence described in Sequence No. 1, from 1 to 1,110 positions of the nucleotide sequence described in Sequence No. 3, from 1 to 1,119 positions of the nucleotide sequence No. 5, from 1 to 1,131 positions of the nucleotide sequence described in Sequence No. 23 or from 1 to 1,119 positions of the nucleotide sequence described in Sequence No. 25.
- [0021] The gene which encodes the G protein-coupled receptor protein of the invention can be obtained by the following methods.
- 1) Production methods of novel G protein-coupled receptor protein gene
- a) First production method
- [0022] A mRNA sample is extracted from human cells or tissue having the ability to produce the G protein-coupled receptor protein of the invention. Next, using this mRNA as the template, two primers interposing the G protein-coupled receptor protein mRNA or a part of the mRNA region is prepared. The G protein-coupled receptor protein cDNA or a part thereof can be obtained by carrying out a reverse transcriptase-polymerase chain reaction (to be referred to as RT-PCR hereinafter) suited for SREB1, SREB2 or SREB3 by modifying the conditions for denature temperature, denaturing agent addition and the like. Thereafter, the receptor protein can be produced by integrating the thus obtained G protein-coupled receptor cDNA or a part thereof into an appropriate expression vector and expressing it in a host cell.
- [0023] Firstly, mRNA molecules including those encoding the G protein-coupled receptor protein of the invention are extracted by a known method from cells or tissue, such as of the human brain or rat brain, having the ability to produce the protein. Regarding the extraction method, a guanidine thiocyanate hot phenol method, a guanidine thiocyanate-guanidine hydrochloride method and the like can be exemplified, and a guanidine thiocyanate cesium chloride method can be cited as a preferred method. The cells or tissue having the ability to produce the protein can be identified by the Northern blotting method using a gene having a nucleotide sequence coding for the protein or a part thereof or by the Western blotting method using an antibody specific for the protein.
- [0024] Purification of mRNA can be carried out in accordance with the conventional method, for example by adhering the mRNA to an oligo(dT) cellulose column and then eluting it therefrom. In addition, the mRNA can be further fractionated, for example, by a sucrose density gradient centrifugation. Alternatively, a commercially available already-extracted mRNA preparation may be used without carrying out the mRNA extraction.
- [0025] Next, a single-stranded cDNA is synthesized from the thus purified mRNA by carrying out a reverse transcriptase reaction in the presence of a random primer or an oligo-dT primer. This synthesis can be carried out in the conventional way. The novel G protein-coupled receptor DNA of interest is amplified by subjecting the thus obtained sin-

gle-stranded cDNA to PCR using two primers interposing a region of the gene of interest. The thus obtained DNA is fractionated, for example, by an agarose gel electrophoresis. As occasion demands, a DNA fragment of interest can be obtained by digesting the DNA with restriction enzymes and then connecting the digests.

b) Second production method

[0026] In addition to the above method, the gene of the invention can also be produced making use of conventional genetic engineering techniques. Firstly, single-stranded cDNA is synthesized using the mRNA obtained by the above method as the template and a reverse transcriptase, and then double-stranded cDNA is synthesized from the single-stranded cDNA. Examples of the method include the S1 nuclease method (Efstratiadis, A. et al. (1976), Cell, 7, 279 - 288), the Land method (Land, H. et al. (1981), Nucleic Acids Res., 9, 2251 - 2266), the O. Joon Yoo method (Yoo, O.J. et al. (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1049 - 1053) and the Okayama-Berg method (Okayama, H. and Berg, p. (1982), Mol. Cell. Biol., 2, 161 - 170).

[0027] Next, the recombinant plasmid obtained by the above method is introduced into an *Escherichia coli* strain, such as DH5α, to effect its transformation, and a transformant can be selected making use of tetracycline resistance or ampicillin resistance as a marker. For example, when the host cell is *Escherichia coli*, transformation of the host cell can be carried out by the Hanahan's method (Hanahan, D. (1983), *J. Mol. Biol.*, 166, 557 - 580), namely a method in which the recombinant DNA is added to competent cells prepared in the presence of CaCl₂ and MgCl₂ or RbCl. In this case, not only a plasmid but also a lambda or the like phage vector can also be used as the vector.

[0028] A strain having DNA coding for the novel G protein-coupled receptor protein of interest can be selected from the thus obtained transformants, for example by the following various methods.

(1) A screening method which uses a synthetic oligonucleotide probe

An oligonucleotide corresponding to the entire portion or a part of the G protein-coupled receptor protein of the invention is synthesized (in this case, it may be either a nucleotide sequence derived using the codon usage or a combination of plural possible nucleotide sequences, and in the latter case, their kinds can be reduced by including inosine), this is used as a probe (labeled with ³²P or ³³P) and allowed to hybridize with DNA samples of transformants, which are denatured and fixed on a nitrocellulose filter, and then a positive strain is screened and selected.

(2) A screening method which uses a probe prepared by polymerase chain reaction

[0030] Sense primer and antisense primer oligonucleotides corresponding to a part of the G protein-coupled receptor protein of the invention are synthesized, and polymerase chain reaction (Saiki, R.K. et al. (1988), Science, 239, 487 - 491) is carried out using a combination of them to effect amplification of a DNA fragment of interest coding for th entire portion or a part of the G protein-coupled receptor protein. As the template DNA to be used herein, cDNA synthesized by the reverse transcription reaction from mRNA of cells capable of producing the G protein-coupled receptor protein or genomic DNA can be used. The thus prepared DNA fragment is labeled with ³²P or ³³P and used as th probe to select a clone of interest by carrying out colony hybridization or plaque hybridization.

(3) A screening method in which the novel G protein-coupled receptor protein is produced in other animal cells

[0031] A transformant is cultured to amplify the gene of interest, the gene is transfected into an animal cell (in this case, either a plasmid which can perform autonomous replication and contains a transcription promoter, region or a plasmid which can be integrated into chromosome of the animal cell may be used) and a protein coded by the gene is produced on the cell surface. By detecting the protein using an antibody specific for the G protein-coupled receptor protein of the invention, a strain of interest having cDNA coding for the G protein-coupled receptor protein is selected from the original transformants.

io. (4) A selection method which uses an antibody specific for the G protein-coupled receptor protein of the invention

[0032] In advance, cDNA is integrated into an expression vector and protein is produced on the surface of transformant strains, and then strains capable of producing the G protein-coupled receptor protein are detected using an antibody specific for the G protein-coupled receptor protein of the invention and a second antibody for the first antibody, thereby selecting a strain of interest.

(5) A method which uses a selective hybridization translation system

[0033] Samples of cDNA obtained from transformants are blotted on, for example, a nitrocellulose filter and hybridized with mRNA prepared from cells capable of producing the G protein-coupled receptor protein of the invention, and then the mRNA linked to the cDNA is dissociated and recovered. The thus recovered mRNA is then translated into protein using a protein translation system, for example by injecting into Xenopus oocyte or in a cell-free system such as a rabbit reticulocyte lysate, wheat germ or the like. A strain of interest is selected by detecting it using an antibody for the G protein-coupled receptor protein of the invention.

[0034] Collection of DNA which encodes the G protein-coupled receptor protein of the invention from the thus obtained transformant of interest can be carried out in accordance with a known method (Maniatis, T. et al. (1982): "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY). For example, it can be carried out by separating a fraction corresponding to a plasmid DNA from cells, and cutting out a cDNA region from the plasmid DNA.

c) Third production method

[0035] The gene which has a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence represented by Sequence No. 2, 4, 6, 22 or 26 can also be produced by binding DNA fragments produced by a chemical synthesis method. Each DNA can be synthesized using a DNA synthesizer (e.g., Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman), 394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems) or the like).

d) Fourth production method

For the purpose of effecting expression of the function of G protein-coupled receptor protein of the invention. by the substance thus obtained by genetic engineering techniques making use of the gene of the invention, it is not always necessary to have all of the amino acid sequences represented by Sequence No. 2, 4, 6, 22 and 26; for example, even if it is a partial sequence or other amino acid sequence is added thereto, such proteins are also included in the G protein-coupled receptor protein of the invention, as long as they show the same activity of the G protein-coupled receptor protein represented by the amino acid sequence shown in Sequence No. 2, 4, 6, 22 or 26. Also, as is known by the interferon gene and the like, it is considered that genes of eucaryote generally show polymorphism (e.g., see Nishi, T. et al. (1985), J. Biochem., 97, 153 - 159), and there is a case in which one or a plurality of amino acid are substituted by this polymorphism or a case in which the nucleotide sequence is changed but the amino acids are completely unchanged. In consequence, even in the case of proteins in which one or a plurality of amino acid residues are substituted, deleted or inserted at one or a plurality of positions in the amino acid sequence represented by Sequence No. 2, 4 or 6, it is possible that they have the same activity of the G protein-coupled receptor represented by the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4 or 6. These proteins are called equivalents to the G protein-coupled receptor protein of the invention and included in the invention. In addition, a G protein-coupled receptor having the rat origin amino acid sequence shown by Sequence No. 22, 24 or 26 or a G protein-coupled receptor having the same activity of the former receptor is also included in the equivalents.

[0037] All of the genes having nucleotide sequences which encode these equivalents to the G protein-coupled receptor protein of the invention are included in the invention. Such various genes of the invention can also be produced by nucleic acid chemical synthesis methods in accordance with a usual method such as the phosphite triester method (Hunkapiller, M. et al. (1984), Nature, 10, 105 - 111), based on the information on the G protein-coupled receptor protein of the invention described in the foregoing. In this connection, codons for desired amino acid are well known, and they can be optionally selected and determined in the usual way, for example by taking codon usage of the host to be used into consideration (Crantham, R. et al. (1981), Nucleic Acids Res., 9, r43 - r74). In addition, partial modification of codons of these nucleotide sequences can be carried out in the usual way in accordance, for example, with the site specific mutagenesis (Mark, D.F. et al. (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662 - 5666) which uses a primer comprised of a synthetic oligonucleotide coding for the desired modification.

[0038] Determination of the sequence of DNA obtained by the above methods a) to d) can be carried out by, for example, the Maxam-Gilbert chemical modification method (Maxam, A.M. and Gilbert, E. (1980): "Methods in Enzymology", 65, 499 - 559) or the dideoxy nucleotide chain termination method (Messing, J. and Vieira, J. (1982), *Gene*, 19, 269 - 276) which uses M13.

[0039] Also, the vector of the invention, the host cell of the invention and the G protein-coupled receptor protein of the invention can be obtained by the following methods. 2) Production method of recombinant protein of the G protein-coupled receptor of the invention

[0040] An isolated fragment containing a gene coding for the G protein-coupled receptor protein of the invention can transform other eucaryotic host cell by again integrating into an appropriate vector DNA. In addition, it is possible to express the gene in r spective host cells by introducing an appropriate promoter and a sequence related to the gene

expression into these vectors.

[0041] Cells of vertebrates, insects, yeast and the like are included in the eucaryotic host cells and, though not particularly limited, examples of commonly used vertebrate cells include COS cell which is a simian cell (Gluzman, Y. (1981), Cell, 23, 175 - 182), a dihydrofolate reductase deficient strain of Chinese hamster ovary cell (CHO) (Urlaub, G. and Chasin, L.A. (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 - 4220), human fetal kidney HEK293 cell and 293-EBNA cell (Invitrogen) prepared by introducing Epstein Barr virus EBNA-1 gene into the human cell.

[0042] As the expression vector for vertebrate cells, a vector which contains a promoter positioned on the upstream of the gene to be expressed, an RNA splicing site, a polyadenylation site, transcription termination sequence and the like can generally be used, and it may further contain a replication origin as occasion demands. Examples of the expression vector include pSV2dhfr having SV40 early promoter (Subramani, S. et al. (1981), Mol. Cell. Biol., 1, 854-864), pEF-BOS having human elongation factor promoter (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990), Nucleic Acids Res., 18, 5322), pCEP4 having cytomegalovirus promoter (Invitrogen) and the like, though not limited thereto.

[0043] In a case in which COS cell is used as the host cell, an expression vector which has SV40 replication origin, can perform autonomous growth in COS cell and has a transcription promoter, a transcription termination signal and an RNA splicing site can be used, and its examples include pME18S (Maruyama, K. and Takebe, Y. (1990), *Med. Immunol.*, 20, 27 - 32), pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990), *Nucleic Acids Res.*, 18, 5322), pCDM8 (Seed, B. (1987), *Nature*, 329, 840 - 842) and the like. The expression vector can be incorporated into COS cell by, for example, the DEAE-dextran method (Luthman, H. and Magnusson, G. (1983), *Nucleic Acids Res.*, 11, 1295 - 1308), the calcium phosphate-DNA co-precipitation method (Graham, F.L. and van der Ed., A.J. (1973), Virology, 52, 456 - 457), a method which uses FuGENE6 (Boeringer Mannheim) or the electroporation method (Neumann, E. *et al.* (1982), *EMBO J.*, 1, 841 - 845), and a desired transformant cell can thus be obtained.

[0044] Also, when CHO cell is used as the host cell, a transformant cell capable of stably producing the novel G protein-coupled receptor protein can be obtained by carrying out co-transfection of an expression vector together with a vector capable of expressing *neo* gene which functions as a G418 resistance marker, such as pRSVneo (Sambrook, J. et al. (1989): "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY) or pSV2-neo (Southern, P.J. and Berg, p. (1982), J. Mol. Appl. Genet., 1, 327 - 341), and selecting a G418 resistant colony. In addition, when 293-EBNA cell is used as the host cell, a desired transformant cell can be obtained using an expression vector which has Epstein Barr virus replication origin and can perform autonomous growth in the 293-EBNA cell, such as pCEP4 (Invitrogen).

[0045] The thus obtained desired transformant can be cultured in the conventional way, and the G protein-coupled receptor protein of the invention is produced inside the cells or on the cell surface by this culturing. Regarding the medium to be used in this culturing, it can be optionally selected from various commonly used media depending on each host cell employed; for example, in the case of the COS cell, RPMI-1640 medium, Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM) or the like can be used by adding serum components such as fetal bovine serum (FBS) and the like as occasion demands. Also, in the case of the 293-EBNA cell, Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM) or the like medium supplemented with serum components such as fetal bovine serum (FBS) and the like can be used by further adding G418.

The G protein-coupled receptor protein of the invention thus produced inside the cell or on the cell surface of the transformant can be separated and purified therefrom by various known separation techniques making use of physical properties, chemical properties and the like of the receptor protein. Illustrative examples of such techniques, to be carried out after solubilization of the receptor protein-containing membrane fraction, include usual treatment with a protein precipitant, ultrafiltration, various liquid chromatography means such as molecular sieve chromatography (gel filtration), adsorption chromatography, ion exchange chromatography, affinity chromatography, high performance liquid chromatography (HPLC) and the like, dialysis and combinations thereof. In this connection, the membrane fraction can be obtained in the usual way. For example, it can be obtained by culturing the cells which expressed the G protein-coupled receptor protein on the surface, suspending them in a buffer and then homogenizing and centrifuging them. Also, when the G protein-coupled receptor protein is solubilized using a solubilizing agent as mild as possible (CHAPS, Triton X-100, digitonin or the like), characteristics of the receptor can be maintained after the solubilization.

[0047] By effecting expression of the G protein-coupled receptor protein of the invention through its in-frame fusion with a marker sequence, confirmation of the expression the G protein-coupled receptor protein, confirmation of its intracellular localization, purification thereof and the like become possible. Examples of the marker sequence include FLAG epitope, Hexa-Histidine tag, Hemagglutinin tag, myc epitope and the like. Also, when a specific sequence recognizable by a protease such as enterokinase, factor Xa or thrombin is inserted between a marker sequence and the G protein-coupled receptor protein, the marker sequence can be cut and removed by such a protease. For example, there is a report in which muscarinic acetylcholine receptor and Hexa-Histidine tag are connected with a thrombin-recognizing sequence (Hayashi, M.K. and Haga, T. (1996), J. Biochem., 120, 1232 - 1238).

[0048] A method for the screening of compounds, peptides and antibodies capable of modifying activity of the G protein-coupled receptor protein is included in the invention. This screening method comprises adding an agent to be

tested to a system in which an index of the modification of G protein-coupled receptor protein in response to a physiological characteristic of the G protein-coupled receptor protein is measured making use of the thus constructed G protein-coupled receptor protein, and measuring the index. The following screening methods can be cited as illustrative examples of this measuring system. Also, examples of useful drugs to be tested include compounds or peptides which are conventionally known to have G protein-coupled receptor ligand activity but their ability to selectively modify activity of the novel G protein-coupled receptor protein is not clear, known compounds and peptides registered in chemical files but their various G protein-coupled receptor ligand activities are unknown, compounds obtained by the method such as combinatorial chemistry techniques (Terrett, N.K. et al. (1995), Tetrahedron, 51, 8135 - 8137) and random peptides prepared by employing a phage display (Felici, F. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222, 301 - 310) or the like. In addition, culture supernatants of microorganisms, natural components originated from plants and marine organisms, animal tissue extracts and the like are also objects of the screening. Also useful are compounds or peptides obtained by chemically or biologically modifying a compound or peptide selected by the screening method of the invention.

- 3) Screening methods of ligands of the G protein-coupled receptor protein of the invention, namely compounds, peptides and antibodies which modify activity of the G protein-coupled receptor protein of the invention
 - a) A screening method which uses a ligand binding assay method
 - [0049] Compounds, peptides and antibodies which bind to the G protein-coupled receptor protein of the invention (generally referred to as ligand) can be screened by a ligand binding assay method. A cell membrane sample obtained after expression of the receptor protein or a purified sample of the receptor protein is prepared, and a ligand purified for use in the ligand binding assay is radiation-labeled (50 to 2,000 Ci/mmol). Buffer solution, ions, pH and the like assay conditions are optimized, and the receptor protein-expressed cell membrane sample or the purified receptor protein sample is incubated in the thus optimized buffer for a predetermined period of time together with the radiation-labeled ligand. After the reaction, this is filtered through, e.g., a glass filter and washed with an appropriate amount of the buffer, and then the radioactivity remained on the filter (total binding amount) is measured using, e.g., a liquid scintillation counter. Nonspecific binding amount is measured by adding the unlabeled ligand in large excess in the reaction solution, and the specific binding amount is obtained by subtracting the nonspecific binding amount from the total binding amount. A ligand showing specific binding to the receptor protein-expressed cell membranes or the purified receptor protein can be selected as a ligand of the G protein-coupled receptor protein of the invention. In addition, a compound, peptide or antibody having agonist activity, or a compound, peptide or antibody having antagonist activity; of the G protein-coupled receptor protein can be screened making use of the binding inhibition of the thus obtained radioactive ligand as an index.
- b) A screening method which uses a GTPγS binding method
 - [0050] Compounds, peptides and antibodies capable of modifying the activity of the G protein-coupled receptor protein of the invention can be screened by a GTPγS binding method (Lazareno, S. and Birdsall, N.J.M. (1993), Br. J. Phaxmacol., 109, 1120 1127). Cell membranes obtained after expression of the receptor protein is mixed with 400 pM of GTPγS labeled with ³⁵S in a solution of 20 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ and 50 mM GDP. After incubation in the presence or absence of an agent to be tested, this is filtered through, e.g., a glass filter and then radioactivity of the bound GTPγS is measured using, e.g., a liquid scintillation counter. A compound, peptide or antibody having agonist activity of the G protein-coupled receptor protein can be screened making use, as an index, of the increased specific GTPγS binding in the presence of the drug to be tested. Also, a compound, peptide or antibody having antagonist activity of the G protein-coupled receptor protein can be screened making use, as an index, of the suppression of increase in the GTPγS binding by the thus obtained compound, peptide or antibody having agonist activity.
 - c) A screening method which uses changes in the intracellular Ca++ and cAMP concentrations
- [0051] Many G protein-coupled receptor proteins induce increase in Ca⁺⁺ and/or increase or decrease in cAMP concentration in the cells caused by an agonist stimulus. Accordingly, compounds, peptides and antibodies capable of modifying the activity of the G protein-coupled receptor protein of the invention can be screened making use of the changes in the intracellular Ca⁺⁺ or cAMP concentration. The Ca⁺⁺ concentration is measured using fura2 and the like, and the cAMP concentration is measured using a commercially available cAMP assay kit (by Amersham, etc.).
- [0052] Alternatively, it is possible to measure the Ca⁺⁺ and cAMP concentrations indirectly, by detecting the transcription activity of a gene whose transcription amount is controlled depending on the Ca⁺⁺ and cAMP concentrations. A sample such as a compound, a peptide, a tissue extract or the like is allowed to react for a predetermined period of time with cells in which the receptor protein is expressed or host cells in which the receptor protein is not expressed

(control cells), and the Ca⁺⁺ and cAMP concentrations are measured directly or indirectly. A compound, peptide or antibody having agonist activity can be screened making use, as an index, of the increase in Ca⁺⁺ and/or increase or decrease in cAMP concentration in the receptor protein-expressed cells by comparing with the control cells. Also, a compound, peptide or antibody having antagonist activity of the G protein-coupled receptor protein can be screened making use, as an index, of the increase in Ca⁺⁺ and/or increase or decrease in cAMP concentration caused by the thus obtained compound, peptide or antibody having agonist activity.

d) A screening method which uses Microphysiometer

[0053] Upon various signal responses of cells, trace amount of hydrogen ions outflow into the extracellular moiety is detected. Most of this outflow of hydrogen ions occur when metabolites formed by the fuel consumption of cells to obtain energy for their responses are increased or when signals of the cells are transmitted directly to the hydrogen ion pump. Since the G protein-coupled receptor protein of the invention requires energy for its signal transmission, outflow of hydrogen ions occurs when the receptor is activated. Since changes in pH caused by such a trace outflow of hydrogen ions in a medium around cells can be detected by CYTOSENSOR Microphysiometer (Molecular Devices), it can be used for the detection of the activation energy consuming receptors.

[0054] A compound, a peptide, a tissue extract or the like is allowed to react for a predetermined period of time with cells in which the receptor protein is expressed or host cells in which the receptor protein is not expressed (control cells), and changes in the pH due to outflow of hydrogen ions are measured. A compound, peptide or antibody having agonist activity can be screened making use, as an index, of the changes in pH caused by the outflow of hydrogen ions from the receptor protein-expressed cells by comparing with the control cells. Also, a compound, peptide or antibody having antagonist activity of the G protein-coupled receptor protein can be screened making use, as an index, of the changes in pH due to the outflow of hydrogen ions caused by the thus obtained compound, peptide or antibody having agonist activity.

[0055] A medicament which contains as the active ingredient a compound, peptide or antibody capable of significantly modifying the activity of the G protein-coupled receptor protein or a G protein-coupled receptor protein selected by the screening method is included in the invention.

[0056] The antibody, such as a polyclonal antibody or monoclonal antibody, which reacts with the G protein-coupled receptor protein of the invention can be obtained by directly administering the novel G protein-coupled receptor protein or a fragment of the G protein-coupled receptor protein to various animals. It can also be obtained by a DNA vaccine method (Raz, E. et al. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9519 - 9523; Donnelly, J.J. et al. (1996), J. Infect. Dis., 173, 314 - 320) using a plasmid in which a gene which encodes the G protein-coupled receptor protein of the invention is introduced.

[0057] The polyclonal antibody is produced from sera or eggs of an animal (e.g., rabbit, rat, goat, fowl or the like) immunized and sensitized by emulsifying the G protein-coupled receptor protein or a fragment thereof in an appropriat adjuvant such as complete Freund's adjuvant and administering it by intraperitoneal, subcutaneous or intravenous injection. The polyclonal antibody thus produced from sera or eggs can be separated and purified by the usual protein isolation purification methods. Examples of such methods include centrifugation, dialysis, salting out with ammonium sulfate, and chromatographic techniques using carriers such as DEAE-cellulose, hydroxyapatite, protein A agarose and the like.

[0058] An active antibody fragment containing a part of the antibody, such as F(ab')2, Fab, Fab' or Fv, can be obtained by digesting the thus separated and purified antibody with a proteolytic enzyme such as pepsin, papain or the like in the usual way and subsequently separating and purifying it by the usual protein isolation purification methods.

[0059] It is possible for those skilled in the art to easily produce a monoclonal antibody by the cell fusion method of Kohler and Milstein (Kohler, G. and Milstein, C. (1975), *Nature*, 256, 495 - 497).

[0060] Mice are immunized by intraperitoneal, subcutaneous or intravenous inoculation of an emulsion prepared by emulsifying the G protein-coupled receptor protein of the invention or a fragment thereof in an appropriate adjuvant such as complete Freund's adjuvant, several times repeatedly at intervals of several weeks. After final immunization, spleen cells are collected and fused with myeloma cells to prepare a hybridoma.

[0061] Myeloma cells having hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase deficiency, thymidine kinase deficiency or the like marker, such as mouse myeloma cell strain P3X63Ag8.U1, are used as the myeloma cells for obtaining the hybridoma. Also, polyethylene glycol is used as the fusing agent. In addition, Eagle's minimum essential medium, Dulbecco's modified minimum essential medium, RPMI-1640 or the like generally used medium is optionally supplemented with 10 to 30% of fetal bovine serum and used as the medium for the preparation of the hybridoma. Fused strains are selected by the HAT selection method. Screening of hybridoma is carried out using a conventional method such as the culture supernatant by ELISA, immunohistological staining or the like or by the screening method described in the foregoing, and a hybridoma clone secreting the antibody of interest is selected. Also, monoclonal nature of the hybridoma is confirmed by repeating subcloning by means of limiting dilution analysis. When the thus

obtained hybridoma is cultured for 2 to 4 days in a medium or for 10 to 20 days in the abdominal cavity of a BALB/c mice pretreated with pristane, the antibody in an amount sufficient for purification is produced.

[0062] The thus produced monoclonal antibody can be separated and purified from the culture supernatant or ascites by the usual protein isolation purification methods. Examples of such methods include centrifugation, dialysis, salting out with ammonium sulfate, and chromatographic techniques using carriers such as DEAE-cellulose, hydroxyapatite, protein A agarose and the like. In addition, the monoclonal antibody or an antibody fragment containing a part thereof can also be produced by integrating entire portion or a part of a gene coding for the antibody into an expression vector and introducing into Escherichia coli, yeast or animal cells. An active antibody fragment containing a part of the antibody, such as F(ab')2, Fab, Fab' or Fv, can be obtained by digesting the thus separated and purified antibody with a proteolytic enzyme such as pepsin, papain or the like in the usual way and subsequently separating and purifying it by the usual protein isolation purification methods.

[0063] In addition, it is possible to obtain an antibody capable of reacting with the G protein-coupled receptor protein of the invention as single chain Fv or Fab by the method of Clackson *et al.* or Zebedee *et al.* (Clackson, T. *et al.* (1991), *Nature*, 352, 624 - 628; Zebedee, S. *et al.* (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 3175 - 3179). It is also possible to obtain a human antibody by immunizing a transgenic mouse in which a mouse antibody gene is replaced by a human antibody gene (Lonberg, N. *et al.* (1994), *Nature*, 368, 856 - 859).

[0064] The medicament of the invention is characterized in that it has a novel pharmacological action to selectively control activity of the G protein-coupled receptor, and examples of the use of the medicament include central nervous system diseases which are induced by abnormalities of the G protein-coupled receptor activity (acceleration, reduction, denaturation and the like) or which express the abnormalities as complications.

[0065] The pharmaceutical preparation which contains a compound, peptide, antibody or antibody fragment capable of modifying activity of the G protein-coupled receptor protein of the invention, as the active ingredient, can be prepared using carriers, fillers and other additives generally used in the preparation of medicaments, in response to each type of the active ingredient.

[0066] Examples of its administration include oral administration in the form of tablets, pills, capsules, granules, fine granules, powders, oral solutions and the like, and parenteral administration in the form of intravenous, intramuscular and the like injections, suppositories, percutaneous preparations, transmucosal absorption preparations and the like. Particularly, in the case of peptides which are digested in the stomach, intravenous injection or the like parenteral administration is desirable.

[0067] In the solid composition for use in the oral administration according to the present invention, one or more active substances are mixed with at least one inert diluent such as lactose, mannitol, glucose, microcrystalline cellulose, hydroxypropylcellulose, starch, polyvinyl pyrrolidone or aluminum magnesium metasilicate. In the usual way, the composition may contain additives other than the inert diluent, for example, a lubricant, a disintegrating agent, a stabilizing agent and a solubilizing or solubilization assisting agent. If necessary, tablets or pills may be coated with a sugar coating or a film of a gastric or enteric substance.

[0068] The liquid composition for oral administration includes emulsions, solutions, suspensions, syrups and elixirs and contains a generally used inert diluent such as purified water or ethanol. In addition to the inert diluent, this composition may also contain other additives such as moistening agents, suspending agents, sweeteners, flavors and antiseptics.

[0069] The injections for parenteral administration includes aseptic aqueous or non-aqueous solutions, suspensions and emulsions. Examples of the diluent for use in the aqueous solutions and suspensions include distilled water for injection use and physiological saline. Examples of the diluent for use in the non-aqueous solutions and suspensions include propylene glycol, polyethylene glycol, plant oils (e.g., olive oil), alcohols (e.g., ethanol), polysorbate 80 and the like. Such a composition may further contain a moistening agent, an emulsifying agent, a dispersing agent, a stabilizing agent, a solubilizing or solubilization assisting agent, an antiseptic and the like. These compositions are sterilized for example by filtration through a bacteria retaining filter, blending of a germicide or irradiation. Alternatively, they may be used by firstly making into sterile solid compositions and dissolving them in sterile water or other sterile solvent for injection use prior to their use.

[0070] The dose is optionally decided by taking into consideration strength of each active ingredient selected by the screening method described in the foregoing and symptoms, age, sex and the like of each patient to be administered.

Brief Description of the Drawings

[0071]

. .

Fig. 1 shows alignment of amino acid sequences of SREB1, SREB2 and SREB3.

Fig. 2 shows a result of Northern analysis of SREB1 in human organs.

Fig. 3 shows a result of Northern analysis of SREB1 in each region of human brain.

- Fig. 4 shows a result of Northern analysis of SREB2 in human organs.
- Fig. 5 shows a result of Northern analysis of SREB2 in each region of human brain.
- Fig. 6 shows a result of Northern analysis of SREB3 in human organs.
- Fig. 7 shows a result of Northern analysis of SREB3 in each region of human brain.
- Fig. 8 shows a result confirming expression of SREB1, SREB2 or SBEB3 protein.
- Fig. 9 shows binding activity of anti-3LO antibody for SREB1, SREB2 or SREB3.
- Fig. 10 shows binding activity of anti-C24 antibody for SREB1.
- Fig. 11 shows pCRE-Luc derived luciferase activity in cells in which SREB1, SREB2 or SREB3 was introduced.
- Fig. 12 shows pSRE-Luc derived luciferase activity in cells in which SREB1, SREB2 or SREB3 was introduced.

Best Mode for Carrying Out the Invention

[0072] In order to disclose the invention further illustratively, Examples are described in the following, but the invention is not limited to these Examples. In this connection, unless otherwise noted, they can be carried out in accordance with known methods (Maniatis, T. et al. (1982): "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY).

(Example 1) Isolation of genes coding for the novel G protein-coupled receptor family proteins

[0073] Full length cDNA coding for the G protein-coupled receptor family protein (SREB1, SREB2 or SREB3) of the invention was obtained by RT-PCR using human brain origin poly A⁺ RNA (Clontech) as the template.

[0074] In the amplification of the novel G protein-coupled receptor human SREB1, 5'-AAAATCTAGA CGCGAT-GGCGAACGCGAGCGA-3' (Sequence No. 7) was used as the forward primer, and 5'-AAAATCTAGA GTCTATGT-GGCGGGGCCTCCC-3' (Sequence No. 8) as the reverse primer (Xbal site is added to each 5' terminus). RT-PCR was carried out using Pfu DNA polymerase (Stratagene) and by repeating a cycle of 98°C (20 seconds)/64°C (30 seconds)/74°C (3 minutes) 34 times in the presence of 5% formamide. As the result, a DNA fragment of about 1.2 kbp was amplified. This fragment was digested with Xbal and then cloned using pCEP4 plasmid (Invitrogen). Since the pCEP4 plasmid contains CMV promoter which shows strong promoter activity in animal cells, it can be used in expressing recombinant proteins in animal cells. Nucleotide sequence of the thus obtained clone was analyzed by the dideoxy terminator method using ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). The thus revealed sequence is shown in Sequence No. 1 of the Sequence Listing.

[0075] This sequence contains an open reading frame of 1,125 bases (from the 1st position to the 1125th position of Sequence No. 1). An amino acid sequence (375 amino acids) deduced from the open reading frame is shown in Sequence No. 2 of the Sequence Listing. Since the deduced amino acid sequence contains seven hydrophobic regions considered to be the transmembrane domains which is a characteristic of the G protein-coupled receptor, it was found that this gene encodes the G protein-coupled receptor.

[0076] In the amplification of the novel G protein-coupled receptor human SREB2, 5'-AAAATCTAGA TCTAT-GGCGAACTATAGCCATGCA-3' (Sequence No. 9) was used as the forward primer, and 5'-AAAATCTAGA AAG-GCTAAAGATTTACAGATGCTCC-3' (Sequence No. 10) as the reverse primer (*XbaI* site is added to each 5' terminus) RT-PCR was carried out using Pfu DNA polymerase (Stratagene) and by repeating a cycle of 96°C (20 seconds) /54°C (30 seconds)/74°C (3 minutes) 34 times. As the result, a DNA fragment of about 1.2 kbp was amplified. This fragment was digested with *XbaI* and then cloned using pCEP4 plasmid (Invitrogen). Nucleotide sequence of the thus obtained clone was analyzed by the dideoxy terminator method using ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). The thus revealed sequence is shown in Sequence No. 3 of the Sequence Listing.

[0077] This sequence contains an open reading frame of 1,110 bases (from the 1st position to the 1130th position of Sequence No. 3). An amino acid sequence (370 amino acids) deduced from the open reading frame is shown in Sequence No. 4 of the Sequence Listing. Since the deduced amino acid sequence contains seven hydrophobic regions considered to be the transmembrane domains which is a characteristic of the G protein-coupled receptor, it was found that this gene encodes the G protein-coupled receptor.

[0078] In the amplification of the novel G protein-coupled receptor human SREB3, 5'-AAAATCTAGA GTAT-GGCCAACACTACCGGAGAG-3' (Sequence No. 11) was used as the forward primer, and 5'-AAAATCTAGA CCTGTCT-GCCTACCAGCCTGC-3' (Sequence No. 12) as the reverse primer (Xbal site is added to each 5' terminus). RT-PCR was carried out using Pfu DNA polymerase (Stratagene) and by repeating a cycle of 98°C (20 seconds)/62°C (30 seconds)/74°C (3 minutes) 34 times in the presence of 5% formamide. As the result, a DNA fragment of about 1.2 kbp was amplified. This fragment was digested with Xbal and then cloned using pCEP4 plasmid (Invitrogen). Nucleotide sequence of the thus obtained clone was analyzed by the dideoxy terminator method using ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). The thus revealed sequence is shown in Sequence No. 5 of the Sequence Listing.

[0079] This sequence contains an open reading frame of 1,119 bases (from the 1st position to the 1119th position

of Sequence No. 5). An amino acid sequence (373 amino acids) deduced from the open reading frame is shown in Sequence No. 6 of the Sequence Listing. Since the deduced amino acid sequence contains seven hydrophobic regions considered to be the transmembrane domains which is a characteristic of the G protein-coupled receptor, it was found that this gene encodes the G protein-coupled receptor.

[0080] Homology of the novel G protein-coupled receptor SREB family (SREB1, SREB2 or SREB3) with a known G protein-coupled receptor family is 25% or less, respectively.

[0081] On the other hand, homology of SREB1 with SREB2 is 52%, homology of SREB1 with SREB3 is 52% and homology of SREB2 with SREB3 is 63%, which are significantly higher than the homology with known G protein-coupled receptors (Fig. 1). This fact shows that the G protein-coupled receptors SREB1, SREB2 and SREB3 of the invention form a novel G protein-coupled receptor family independent of the known G protein-coupled receptors.

(Example 2) Expression distribution of human novel G protein-coupled receptor family genes in tissues

Expression distribution of the G protein-coupled receptor genes of the invention was analyzed by the north-[0082] ern blot hybridization method. A cDNA fragment (from the 722nd position to the 1054th position in Sequence No. 1) was used as the probe of human SREB1. Poly A⁺ RNA (2 μg) originated from each of human organs was blotted on a membrane (Clontech), and its hybridization with the probe was carried out at 42°C (18 hours) in a solution containing 50% formamide, $5 \times SSPE$, $10 \times Denhardt's$ solution, 2% SDS and $100 \, \mu g/ml$ denatured salmon sperm DNA. The membrane was finally washed twice (65°C for 30 minutes) with a solution containing 02 x SSC and 0.1% SDS. As shown in Fig. 2, when the northern analysis was carried out on each of human organs (heart, brain, placenta, lung, liver, skeletal muscle, kidney, pancreas, spleen, thymus, prostate, testis, ovary, small intestine, large intestine and peripheral leukocyte), 3 kb of mRNA was detected in the brain, ovary, testis, heart and prostate, and 3 kb and 2.3 kb mRNA in the peripheral leukocyte. Also, a signal of 3 kb was slightly detected in the pancreas, too. In addition, the northern analysis was also carried out on each of the regions of the human brain (amygdala, caudate nucleus, corpus callosum, hippocampus, substania nigra, subthalamic nucleus, thalamus, cerebellum, cerebral cortex, medulla, spinal cord, occipital lobe, frontal lobe, temporal lobe and putamen). Since the 3 kb mRNA of the C protein-coupled receptor human SREB1 gene of the invention was detected in all of the examined human brain regions, it was found that it is expressed broadly in the human brain (Fig. 3).

[0083] A cDNA fragment (from the 558th position to the 888th position in Sequence No. 3) was used as the probe of human SREB2. When the northern analysis was carried out under the same conditions, 3.2 kb mRNA was detected in the brain, and 2.4 kb, 3.5 kb and 6.3 kb mRNA in the testis, as shown in Fig. 4. Also, the signal of 3.5 kb was detected in the placenta and spleen, and the signal of 3.2 kb in small intestine, all slightly. Among regions in the brain, the 3.2 kb mRNA of the G protein-coupled receptor human SREB2 gene of the invention was abundantly detected in the amygdala, caudate nucleus, hippocampus, substania nigra, subthalamic nucleus, thalamus, cerebellum, cerebral cortexes and putamen, but not so much in the corpus callosum, medulla and spinal cord. In addition, a signal of 7.8 kb was slightly detected in each of the grain regions (Fig. 5)

[0084] A cDNA fragment (from the 1st position to the 652nd position in Sequence No. 5) was used as the probe of human SREB3. When the northern analysis was carried out under the same conditions, 4 kb and 5.1 kb mRNA was detected in the brain, and 4 kb, 5.1 kb and 9.7 kb mRNA in the ovary, as shown in Fig. 6. The G protein-coupled receptor human SREB3 gene of the invention was detected in each region of the brain as signals of mainly 4 kb, 5.1 kb and slightly 9.7 kb, and the 4 kb mRNA was detected in the amygdala, hippocampus, subthalamic nucleus, cerebellum and cerebral cortex, and the 5.1 kb mRNA in the substania nigra, subthalamic nucleus and spinal cord, relatively abundantly (Fig. 7).

[0085] The above results showed that the G protein-coupled receptor family genes SREB1, SREB2 and SREB3 of the invention are expressed mainly in the central nervous system and urinary organ/reproductive organ system.

(Example 3) Confirmation of the expression of the novel human G protein-coupled receptor family proteins

[0087] A 1 x 10⁶ cells portion of 293-EBNA (Invitrogen) was inoculated into a 10 cm Petri dish and cultured for 1 day, and then gene transfer of 8 µg of pCEP4-FL-SREB1, pCEP4-FL-SREB2, pCEP4-FL-SREB3 or pCEP4-FL (vector alone) was carried out using FuGENE6 (Boeringer Mannheim). After the gene transfer, the cells were cultured for 1 day,

harvested, washed, suspended in 20 mM of Tris-HCl (pH 7.4)/150 mM NaCl/Complete™ (Boeringer Mannheim) and then homogenized using Polytron. The homogenate was mixed with Triton X-100, Digitonin and sodium cholate to final concentrations of 0.2%, 0.1% and 0.2% and then solubilized by incubating at 4°C for 2 hours. Immunoprecipitation of the FLAG epitope fusion protein from the thus solubilized sample was effected using M2-agarose (Sigma). The immune precipitate was eluted with 200 µM FLAG peptide/20 mM Tris-HCl (pH 7.4)/150 mM NaCl. The eluted sample was concentrated, subjected to electrophoresis using SDS/10%-20% acrylamide gel (Daiichi Pure Chemicals) and then transferred on a PVDF membrane using a blotting apparatus. The PVDF membrane after the transfer was subjected to blocking and then allowed to react with a mouse anti-FLAG monoclonal antibody (M2; Sigma) and a horseradish peroxidase-labeled rabbit anti-mouse IgG polyclonal antibody (Zymed) in that order. After the reaction, expression of SREB1, SREB2 or SREB3 protein was confirmed using ECL Western Blotting Detection System (Amersham-Pharmacia) (Fig. 8).

[0088] The protein capable of reacting with the anti-FLAG antibody was not present in the cells in which pCEP4-FL was introduced but detected in the cells in which pCEP4-FL-SREB1, pCEP4-FL-SREB2 or pCEP4-FL-SREB3 was introduced as a band of 35 to 45 kDa. Estimated molecular weights of human SREB1, human SREB2 and human SREB3 were 39.8 kDa, 42.0 kDa and 41.5 kDa, respectively, and their bands were found at positions of almost expected molecular weights. In addition, a band of 65 to 75 kDa considered to be a dimer was detected in the case of human SREB1.

(Example 4) Isolation of gene coding for rat SREB1 (rSREB1), rat SREB2 (rSREB2) or rat SREB3 (rSREB3) protein

[0089] Complete length cDNA coding for rSREB2, rSREB2 or rSREB3 was obtained by RT-PCR using rat brain origin poly A⁺ RNA (Clontech) as the template.

[0090] In the amplification of rSREB1, 5'-AAAATCTAGACGGCGATGGCGAACGCTAGTGA-3' (Sequence No. 15) was used as the forward primer, and 5'-AAAATCTAGA CACTTTGAGAGTCTTGTGAAGGC-3' (Sequence No. 16) as the reverse primer (Xbal site is added to each 5' terminus). Amplification, cloning and nucleotide sequence determination of cDNA were carried out by the same methods of Example 1. The thus revealed sequence is shown in Sequence No. 21 of the Sequence Listing.

[0091] This sequence contains an open reading frame of 1,131 bases (from the 1st position to the 1131st position of Sequence No. 21). An amino acid sequence (377 amino acids) deduced from the open reading frame is shown in Sequence No. 22 of the Sequence Listing. Since the deduced amino acid sequence coincided in 97% frequency with the human SREB1, it was found that this gene encodes rSREB1.

[0092] In the amplification of rSREB2, 5'-AAAATCTAGATCTATGGCGAACTATAGCCATGC-3' (Sequence No. 17) was used as the forward primer, and 5'-AAAATCTAGA AAGGCTAAAGATTTACAGATGCTCC-3' (Sequence No. 18) as the reverse primer (Xbal site is added to each 5' terminus) Amplification, cloning and nucleotide sequence determination of cDNA were carried out by the same methods of Example 1. The thus revealed sequence is shown in Sequence No. 23 of the Sequence Listing.

[0093] This sequence contains an open reading frame of 1,110 bases (from the 1st position to the 1110th position of Sequence No. 23). An amino acid sequence (370 amino acids) deduced from the open reading frame is shown in Sequence No. 24 of the Sequence Listing. Since the deduced amino acid sequence coincided in 100% frequency with the human SREB2, it was found that this gene encodes rSREB2.

[0094] In the amplification of rSREB3, 5'-AAAATCTAGACAAATACTGAACTGGCCGATCCCC-3' (Sequence No. 19) was used as the forward primer, and 5'-AAAATCTAGA TGTTGGCCCCAGTATGGTGATCAT-3' (Sequence No. 20) as the reverse primer (Xbal site is added to each 5' terminus). Amplification, cloning and nucleotide sequence determination of cDNA were carried out by the same methods of Example 1. The thus revealed sequence is shown in Sequence No. 25 of the Sequence Listing.

[0095] This sequence contains an open reading frame of 1,119 bases (from the 1st position to the 1119th position of Sequence No. 25). An amino acid sequence (373 amino acids) deduced from the open reading frame is shown in Sequence No. 26 of the Sequence Listing. Since the deduced amino acid sequence coincided in 99% frequency with the human SREB3, it was found that this gene encodes rSREB3.

(Example 5) Preparation of antibody for human SREB1

[0096] A partial amino acid sequence of human SREB1 was fused with glutathione-S-transferase (GST) and used as the immunization antigen for the preparation of antibody for human SREB1. Illustratively, a cDNA fragment corresponding to a region of from the 208th position to the 282nd position (3LO) and a region of from the 351st position to the 375th position (C24) of the human SREB1 amino acid sequence (Sequence No. 2) was amplified by PCR in an way to bind cleavage sites of restriction nzymes BamHI and XhoI, and inserted between BamHI and XhoI sites of GST Gene Fusion Vector (pGEX-5X-1: Amersham-Pharmacia). Competent cells of an Escherichia coli strain

20

3*0*

35 tid

.

.

BL21(DE3)pLysS (Novagen) were transformed with the thus constructed plasmid. By culturing the transformant and inducing expression of the gene with 1 mM IPTG, a GST-3LO fusion protein and a GST-C24 fusion protein were expressed in the *E. coli* cells. The GST-3LO and GST-C24 were purified from disrupted *E. coli* cells using Glutathione Sepharose 4B (Amersham-Pharmacia) in accordance with the instruction attached thereto.

[0097] The thus purified GST-3LO fusion protein was mixed with the same amount of Freund's complete adjuvant (CalBioChem) and emulsified, and the emulsion was administered to a female white Leghorn (140 days of age) at around the bursa of Fabricius. The initial dose was 1 mg, and it was administered thereafter in 0.5 mg portions 4 times at intervals of 2 weeks. After the final immunization, eggs were collected, the yolk of eggs was diluted with physiological saline and defatted using dextran sulfate, and then IgY was purified using DEAE Sepharose (Amersham-Pharmacia) to obtain anti-3LO antibody. Also, the purified GST-C24 fusion protein was mixed with the same amount of TiterMax Gold (CytRX) and emulsified, and the emulsion was administered under the dorsal skin of a Japanese white rabbit (6 weeks of age). Its initial dose was 1 mg, and it was administered thereafter in 0.5 mg portions 2 times at intervals of 2 weeks. After the final immunization, blood was collected, and IgG was purified from the serum using Protein G Sepharose (Amersham-Pharmacia) in accordance with the instruction attached thereto, thereby obtaining anti-C24 antibody.

[0098] Since the anti-3LO antibody uses a region of from the 208th position to the 282nd position of the human SREB1 amino acid sequence (Sequence No. 2) as the antigen and this partial amino acid sequence contains a large number of sequences common to SREB1, SREB2 and SREB3 (cf. Fig. 1), there is a possibility that the anti-3LO anti-body commonly recognizes SREB1, SREB2 and SREB3. Also, since the anti-C24 antibody uses a region of from the 351st position to the 375th position of the human SREB1 amino acid sequence (Sequence No. 2) as the antigen and this partial amino acid sequence is a sequence in which SPEB2 and 3 are not present but SREB1 alone is present (cf. Fig. 1), there is a possibility that the anti-C24 antibody recognizes only SREB1. In consequence, in order to confirm the specificity of anti-3LO antibody and anti-C24 antibody, Western blotting was carried out using the immune precipitate of anti-FLAG antibody of 293-EBNA in which SREB1, SREB2 or SREB3 was expressed, prepared in Example 3, and the anti-3LO antibody and anti-C24 antibody.

[0099] Illustratively, each sample was subjected to electrophoresis using SDS/10%-20% acrylamide gel (Dalichi Pure Chemicals) and then transferred on a PVDF membrane using a blotting apparatus. The PVDF membrane after the transfer was subjected to blocking and then allowed to react with 10 μg/ml of the anti-3LO antibody and a horseradish peroxidase-labeled rabbit anti-chicken IgG polyclonal antibody (Zymed) in that order or with 10 μg/ml of the anti-C24 reaction, color development was carried out using ECL Western Blotting Detection System (Amersham-Pharmacia). A cells in which pCEP4-FL-SREB1, pCEP4-FL-SREB2 or pCEP4-FL-SREB3 (Fig. 9) was introduced. Also, a band reacting with the anti-C24 antibody was detected at the same position of the anti-FLAG antibody of Example 3 in ing with the anti-C24 antibody was detected at the same position of the anti-FLAG antibody of Example 3 only in the cells in which pCEP4-FL-SREB1 was introduced (Fig. 10).

[0100] Based on the above results, it was confirmed that the anti-3LO antibody is an antibody which recognizes SREB1, SREB2 or SREB3, and the anti-C24 antibody is an antibody which recognizes only SREB1. The use of these antibodies has rendered possible the detection of natural SREB1, SREB2 or SREB3 by the method such as the Western blotting, immunohistological staining or the like.

(Example 6) Evaluation of transcription activity via cAMP-response element (CRE) or serum response element (SRE) in human SREB1-, SREB2- or SREB3-introduced cells

[0101] Increase in the transcription activity mediated by CRE or SRE is induced by the activation of the intracellular information transmission system of various G protein-coupled receptors (Lolait, S.J. et al. (1992), Nature, 357, 336-339; Hoeltzel, W.L. et al. (1997), Am. J. Physiol., 273, C2037 - C2045; An, S. et al. (1998), J. Biol. Chem., 273, 7906 - 7910). Also, it is known that the intracellular information transmission system of G protein-coupled receptors is partially activated via a certain transitional active conformation even in the absence of agonist (Kenakin, T. (1995), Trens. Pharmacol. Sci., 16, 188 - 192). Accordingly, if changes in the CRE- or SRE-mediated transcription activity in SREB1-, SREB2- or SREB3-introduced cells are found even in the absence of agonist, it can be confirmed that the G protein-coupled receptor is functional and that activation of the G protein-coupled receptor intracellular information transmission system leads to the CRE- and SRE-mediated transcription activity.

[0102] Using pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990), *Nucleic Acids Res.*, 18, 5322) as the expression vector for expressing human SREB1, SREB2 or SREB3, pEF-BOS-SREB1, pEF-BOS-SREB2 and pEF-BOS-SREB3 were prepared. A 8 × 10⁴ cells portion of 293-EBNA (Invitrogen) was inoculated into a 24-well plate and cultured for 1 day, and then gene transfer of 250 ng of pEF-BOS-SREB1, pEF-BOS-SREB2, pEF-BOS-SREB3 or pEF-BOS (vector alone) was carried out together with 25 ng of a CRE-reporter plasmid pCRE-Luc (Stratagene) or an SRE-reporter plasmid pSRE-Luc (Stratagene), using FuGENE6 (Boeringer Mannheim) (3 wells for each). After the gene transfer, the cells were lysed at every 12 hours using PicaGene Cell Culture Lysis Reagent Luc (Nippon Gene), and the activity of luci-

ferase produced from each reporter plasmid was measured using PicaGene Luminescence Kit (Nippon Gene).

[0103] The luciferase activity in the SREB1-, SREB2- or SREB3-introduced cells after 24 hours of the gene transfer was treated as a relative activity to the luciferase activity of the vector alone introduced cells (control) (the control was defined as 1), with the results shown in Fig. 11 (pCRE-Luc derived luciferase activity) and Fig. 12 (pSRE-Luc derived luciferase activity). The CRE-mediated transcription activity increased most sharply in the SREB1-introduced cells and also increased significantly in the SREB2- and SREB3-introduced cells in comparison with the control. On the other hand, the SRE-mediated transcription activity increased most sharply in the SREB2-introduced cells and also increased significantly in the SREB1- and SREB3-introduced cells in comparison with the control.

[0104] It was revealed by these results that the SREB1, SREB2 and SREB3 are functional receptors, and activation of the intracellular information transmission system of these G protein-coupled receptors leads to the increase in the CRE- or SRE-mediated transcription activity.

Industrial Applicability

[0105] Novel G protein-coupled receptor family proteins SREB1, SREB2 and SREB3 expressing in the central nervous system, genes coding for these proteins, vectors containing these genes, host cells containing these vectors and methods for producing these G protein-coupled receptor proteins were provided by the present invention.

[0106] Also, it rendered possible to screen new medicaments, particularly new therapeutic agents for central nervous system diseases, through the screening of compounds, peptides and antibodies capable of modifying activities of the G protein-coupled receptor proteins of the invention by allowing the G protein-coupled receptors to contact with drugs to be tested.

Regarding the medicament of the invention which contains, as the active ingredient, a compound, peptide or antibody capable of specifically modifying activity of the G protein-coupled receptor proteins expressing in the central nervous system, its usefulness as therapeutic agents and the like for functional/organic diseases of the central nervous system. Also, since the G protein-coupled receptor family proteins of the invention are expressed not only in the central nervous system but also in the urinary organ/reproductive organ system, usefulness as therapeutic drugs and the like for diseases related to the urinary organ/reproductive organ system can be expected from the medicament which contains, as the active ingredient, a compound, peptide or antibody capable of specifically modifying their activities. In addition, since a member of the G protein-coupled receptors of the invention, such as SREB1 protein, is expressed not only in the central nervous system and urinary organ/reproductive organ system but also in the heart and peripheral leukocytes, a medicament which contains, as the active ingredient, a compound, peptide or antibody capable of specifically modifying the activity of SREB1 protein can be expected for its usefulness as therapeutic drugs and the like for circulatory system diseases and immune inflammation system diseases, in addition to central diseases and diseases related to the urinary organ/reproductive organ system.

[0108] The novel G protein-coupled receptor family SREB1, SREB2 or SREB3 of the invention has markedly high conservation ratio of amino acids in human and rat. This conservation ratio is most highest among the existing G protein-coupled receptor families, which seems to show that the novel G protein-coupled receptor family of SREB1, SREB2 and SREB3 is taking important roles in the living body, particularly a physiological role in the central nervous system. Also, since their amino acid sequences have a conversation ratio of 97% or more in human and rat, it is considered that almost no interspecies differences are present regarding activities of drugs which act upon the novel G protein-coupl d receptor family SREB1, SREB2 or SREB3. In consequence, when the G protein-coupled receptor protein of the invention itself or a compound or protein obtained by a screening using the receptor is developed as a medicament, the receptor has an advantage in that animal experiments using rats, for example, can be carried out in advance, prior to testing pharmacological effects on human, and is useful in terms that clinical data on human can be easily predicted from the animal experiment data.

[0109] Since expression of the G protein-coupled receptor proteins of the invention in organs and changes thereof can be detected by the method such as ELISA, radioimmunoassay, the Western blotting and the like using the antibodies, these antibodies for the novel G-protein coupled receptor proteins are useful as diagnostic agents. In addition, the antibodies capable of modifying activities of the novel G protein-coupled receptor proteins are useful as therapeutic drugs for diseases in which the novel G protein-coupled receptor proteins are involved and also as tools for the separation and purification of the receptor proteins.

SEQUENCE LIST

	<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.	
5	<120> A novel G protein coupled receptor protein	
	<130> Y9905-PCT	
	ولا مراجع بهراج المراجع المستحدي والمستحد المستحد والمراجع والمراجع والمستحد المراجع والمستحد والمستحد والمستح والمراجع والمراجع والمستحد والمراجع والمستحد والمستحد والمراجع والمستحد والمستحد والمستحد والمستحد والمستحد وا	<u>.</u>
10	<150> JP P1998-060245 <151> 1998-03-12	
	<150> JP P1999-026774 <151> 1999-02-03	,.
15	<160> 26	
	<170> Patentin Ver. 2.0	
20	<210> 1 <211> 1128 <212> DNA	
	(213) Homo sapiens	
25	<pre><220></pre>	
	<400> 1	
30	atg gcg aac gcg agc gag ccg ggt ggc agc ggc ggc ggc gag gcg gcc 48. Met Ala Asn Ala Ser Glu Pro Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Ala Ala	
	gee etg gge etc aag etg gee aeg etc age etg etg etg tge gtg age 96	
35	Ala Leu Gly Leu Lys Leu Ala Thr Leu Ser Leu Leu Cys Val Ser 20 25 30	
	cta gcg ggc aac gtg ctg ttc gcg ctg ctg atc gtg cgg gag cgc agc 144 Leu Ala Gly Asn Val Leu Phe Ala Leu Leu Ile Val Arg Glu Arg Ser 35 40 45	, .
40	ctg cac cgc gcc ccg tac tac ctg ctg ctc gac ctg tgc ctg gcc gac 192 Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Leu Leu Leu Asp Leu Cys Leu Ala Asp	
	50 55 60	
45	ggg ctg cgc gcg ctc gcc tgc ctc ccg gcc gtc atg ctg gcg gcg cgg Gly Leu Arg Ala Leu Ala Cys Leu Pro Ala Val Het Leu Ala Ala Arg 65 70 75 80	
	cgt gcg gcg gcg gcg ggg gcg ccg ccg ggc gcg ctg ggc tgc aag 288 Arg Ala Ala Ala Ala Ala Bly Ala Pro Pro Gly Ala Leu Gly Cys Lys 85 90 95	٠.
50	ctg ctc gcc ttc ctg gcc gcg ctc ttc tgc ttc cac gcc gcc ttc ctg 336 Leu Leu Ala Phe Leu Ala Ala Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe Leu	
	100 105 110	

<i>5</i>				Val					Tyr					His		cgc	384
			.Ala					Gly					Ala			gtg Val	432
10		Ala					Ala					Phe				ctg Leu 160	480
15		ggc				Asp					Cys					Arg	528
	ccc Pro	gac	ggc Gly	gcc Ala 180	Pro	ggc Gly	gcg Ala	ctg Leu	ggc Gly 185	Phe	ctg	c t g Leu	ctg Leu	ctg Leu 190	gcc	etg Val	576
20		gtg Val												Phe		atc He	524
<i>25</i>		gac Asp 210															672
30		Asp															720
	aac Asn	tgg Trp												Ala			768
35		atc He															816
40	ctg Leu	gaz Glu															864 -
45	gtc					Lev											912
	tac Tyr 305	Leu			Leu					Ala					Tyr		960
50	acg Thr			Val					Ala					Aśn .		Yai	1008
		•												4, .			

Phe Pro Cys Cys Gin Ser Pro Arg Thr Thr Gin Ala Thr His Pro Cys 355 360 365 365 365 366 365 375 375 376 376 377 377 378 378 379 378 379 379 379 379 379 379 379 379 379 379	5	gt Va	g tg I Cy	c ti	c ct e Le 34	u Ph	c aa	ic ag in Ar	g ga g Gl	g ct u Le 34	u Ar	g ga g As	c tg p Cy	c tt	c ag le Ar 35	g gc g Al	c cas a Gli	z 1056
Asp Leu Lys Gly lie Gly Leu 370 375 (210) 2 (211) 375 (212) PRT (213) Homo sapiens (400) 2 Met Ala Asn Ala Ser Glu Pro Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Ala Ala 1 5 10 15 Ala Leu Gly Leu Lys Leu Ala Thr Leu Ser Leu Leu Leu Cys Val Ser 20 25 30 Leu Ala Gly Asn Val Leu Phe Ala Leu Leu lie Val Arg Glu Arg Ser 35 40 45 Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Leu Leu Leu Asp Leu Cys Leu Ala Asp 50 55 60 Gly Leu Arg Ala Leu Ala Cys Leu Pro Ala Val Met Leu Ala Ala Arg 65 70 75 80 Arg Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Pro Pro Gly Ala Leu Gly Cys Lys 85 90 95 Leu Leu Ala Phe Leu Ala Ala Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe Leu 100 105 116 Leu Leu Gly Val Gly Val Thr Arg Tyr Leu Ala Ile Ala His His Arg 115 120 Phe Tyr Ala Glu Arg Leu Ala Gly Trp Pro Cys Ala Ala Net Leu Val 130 135 140 Asp Gly Gly Asp Asp Glu Asp Ala Pro Cys Ala Leu Glu Gln Arg 165 170 175		t t Ph	c cc e Pr	о Су	s Cy	c ca s Gl	g ag n Se	c cc r Pr	o Ar	g Th	c ac r Th	c ca r GI	g gc n Al	g ac a Th 36	c ca r Hi 5	t cc s Pr	c tgc o Cys	1104
15	10	gā Asj	p Le	u Ly	a gg s G)	cat y 11	t gg e Gi	y Le	ָ ָ ע									1128
212) PRT 213) Homo sapiens 2400) 2 Met Ala Asn Ala Ser Glu Pro Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Ala Ala 1 5 10 Ala Leu Gly Leu Lys Leu Ala Thr Leu Ser Leu Leu Leu Cys Val Ser 20 25 30 Leu Ala Gly Asn Val Leu Phe Ala Leu Leu IIe Val Arg Glu Arg Ser 35 40 Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Leu Leu Leu Asp Leu Cys Leu Ala Asp 50 55 60 Gly Leu Arg Ala Leu Ala Cys Leu Pro Ala Val Met Leu Ala Ala Arg 65 70 75 80 Arg Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Pro Pro Gly Ala Leu Gly Cys Lys 85 90 95 Leu Leu Ala Phe Leu Ala Ala Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe Leu 100 105 110 40 Leu Leu Gly Val Gly Val Thr Arg Tyr Leu Ala IIe Ala His His Arg 115 120 Phe Tyr Ala Glu Arg Leu Ala Gly Trp Pro Cys Ala Ala Net Leu Val 130 135 150 155 160 Asp Gly Gly Gly Asp Asp Glu Asp Ala Pro Cys Ala Leu Glu Gln Arg 165 170 Asp Gly Gly Gly Asp Asp Glu Asp Ala Pro Cys Ala Leu Glu Gln Arg	15		10> :	2 ,-										·				
Met Ala Asn Ala Ser Glu Pro Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ala 1 5 10 15 Ala Leu Gly Leu Lys Leu Ala Thr Leu Ser Leu Leu Leu Cys Val Ser 20 25 30 25 Leu Ala Gly Asn Val Leu Phe Ala Leu Leu lie Val Arg Glu Arg Ser 35 40 45 Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Leu Leu Leu Asp Leu Cys Leu Ala Asp 50 55 60 Gly Leu Arg Ala Leu Ala Cys Leu Pro Ala Val Met Leu Ala Ala Arg 65 70 75 80 Arg Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Pro Pro Gly Ala Leu Gly Cys Lys 85 90 95 Leu Leu Ala Phe Leu Ala Ala Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe Leu 100 105 110 40 Leu Leu Gly Val Gly Val Thr Arg Tyr Leu Ala lie Ala His His Arg 115 120 Phe Tyr Ala Glu Arg Leu Ala Gly Trp Pro Cys Ala Ala Met Leu Val 130 135 140 45 Cys Ala Ala Trp Ala Leu Ala Leu Ala Ala Ala Phe Pro Pro Val Leu 145 150 155 160 Asp Gly Gly Gly Asp Asp Glu Asp Ala Pro Cys Ala Leu Glu Gin Arg		<21 <21	12> 1 13> 1	PRT Iomo	sapi	ens												
Leu Ala Gly Asn Val Leu Phe Ala Leu Leu lie Val Arg Glu Arg Ser 35	20	He l	Ala	ASI	• • • • • •		,				10)		13.1 - 12		15		
Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Leu Leu Asp Leu Cys Leu Ala Asp 50 55 60 Gly Leu Arg Ala Leu Ala Cys Leu Pro Ala Val Met Leu Ala Ala Arg 65 70 75 80 Arg Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Pro Pro Gly Ala Leu Gly Cys Lys 85 90 95 Leu Leu Ala Phe Leu Ala Ala Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe Leu 100 105 110 40 Leu Leu Gly Val Gly Val Thr Arg Tyr Leu Ala Ile Ala His His Arg 115 120 125 Phe Tyr Ala Glu Arg Leu Ala Gly Tro Pro Cys Ala Ala Net Leu Val 130 135 140 45 Cys Ala Ala Tro Ala Leu Ala Leu Ala Ala Ala Phe Pro Pro Val Leu 145 150 155 160 Asp Gly Gly Gly Asp Asp Glu Asp Ala Pro Cys Ala Leu Glu Glo Arg 165 170 175	25			Gly	20 Asn)				25					30	Period Notae		
Gly Leu Arg Ala Leu Ala Cys Leu Pro Ala Val Met Leu Ala Ala Arg 65 70 75 80 Arg Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Pro Pro Gly Ala Leu Gly Cys Lys 85 90 95 Leu Leu Ala Phe Leu Ala Ala Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe Leu 100 105 110 40 Leu Leu Gly Val Gly Vai Thr Arg Tyr Leu Ala Ile Ala His His Arg 115 120 125 Phe Tyr Ala Glu Arg Leu Ala Gly Trp Pro Cys Ala Ala Ala Net Leu Val 130 135 140 45 Cys Ala Ala Trp Ala Leu Ala Leu Ala Ala Ala Phe Pro Pro Val Leu 145 150 155 160 Asp Gly Gly Gly Asp Asp Glu Asp Ala Pro Cys Ala Leu Glu Gln Arg 165 170	30	Leu				Pro	Туг		Leu		Leu	Asp	Leu 60	45 Cys	Leu	Ala	Åsp	
Leu Leu Ala Phe Leu Ala Ala Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe Leu 100 105 110 Leu Leu Gly Val Gly Val Thr Arg Tyr Leu Ala Ile Ala His His Arg 120 125 Phe Tyr Ala Glu Arg Leu Ala Gly Trp Pro Cys Ala Ala Met Leu Val 130 135 140 Cys Ala Ala Trp Ala Leu Ala Leu Ala Ala Ala Phe Pro Pro Val Leu 145 150 155 160 Asp Gly Gly Gly Asp Asp Glu Asp Ala Pro Cys Ala Leu Glu Gin Arg 165 170 175				Arg	Ala	Leu	Ala 70	Cys	Leu	Pro	Ala	Va I 75	Het	Leu	Ala	Ala		
Leu Leu Gly Val Gly Val Thr Arg Tyr Leu Ala lle Ala His His Arg 115 Phe Tyr Ala Glu Arg Leu Ala Gly Trp Pro Cys Ala Ala Met Leu Val 130 135 Cys Ala Ala Trp Ala Leu Ala Leu Ala Ala Ala Phe Pro Pro Val Leu 145 Asp Gly Gly Asp Asp Glu Asp Ala Pro Cys Ala Leu Glu Gin Arg 155 170 175	35	1				85					90			`		95		
Phe Tyr Ala Giu Arg Leu Ala Giy Trp Pro Cys Ala Ala Met Leu Vai 130 135 140 Cys Ala Ala Trp Ala Leu Ala Leu Ala Ala Phe Pro Pro Val Leu 145 150 155 160 Asp Giy Giy Asp Asp Giu Asp Ala Pro Cys Ala Leu Giu Gin Arg					100	3 . 1 . A				105					110			
Cys Ala Ala Trp Ala Leu Ala Leu Ala Ala Phe Pro Pro Val Leu 145 150 155 160 Asp Gly Gly Asp Asp Glu Asp Ala Pro Cys Ala Leu Glu Gin Arg 165 170 175	40			115	i.				120			7,		125	,			
145 150 155 160 Asp Gly Gly Asp Asp Glu Asp Ala Pro Cys Ala Leu Glu Gin Arg 165 170 175	45		130			•		135				5	140					
1. 175 Page 175 Page 176 Page 176 Page 176 Page 1775 Pag		145				1.	150				4	155					160	
Pro Asp Gly Ala Pro Gly Ala Leu Gly Phe Leu Leu Leu Leu Ala Val 180 185 190	50				Ala	155			Leu	Gly	170	¥,r		ingen Græne	Leu	175	2.54	

		••.	Val	l Val	G1) 195		Thi	r Hi:	s Lei	200		r Let	Arg		Leu 205		Phe	ile	
			His	Asp 210		Arg	Lys	He!	Arg 215		Ala	Arg	Leu	Va1 220		Ala	Vai	Ser	
•			Hi s 225		Trp	Thr	Phe	His 230		· Pro	Gly	Ala	Thr 235	_	Gin	Ala	Ala	A1a 240	•
," 			Asn	Trp	Thr	Ala	G1 y 245		Gly 	Arg	Gly	Pro 250	Thr	Pro	Pro		Leu 255	Val	
5			Gly	He	Arg	Pro 260		Gly	, Pro	Gly	Arg 265		Ala	Arg	Arg	Leu 270	Leu	Val.	
			Leu	Glu	G1u 275	Phe	Lys	Thr	Giu	Lys 280		Lev	Cys	Lys	Me t 285	Phe	Tyr	Ala	
9		. • •	Val	Th <i>r</i> 290		Leu	Phe	Leu	Leu 295		Trp	Gly	Pro	Tyr 300	Vaļ	Yal	Ala	Ser	
			Tyr 305	Leu	Arg	Val	Leu	Val 310	Arg	Pro	Gly	Ala	Val 315	Pro	Gin	Ala	Tyr	Leu 320	• • • • •
5			Thr	Ala	Ser	Val	Trp 325	Leu	Thr	Phe	Ala	GIn 330	Ala	Gly	He		Pro 335	Yai	•
		. ,	Yai	Ċys	Phe	Leu 340	Phe	Åsn	Arg	Glu	Leu 345	Arg	qzA	Cys	Phe	Arg 350	Ala	Gin	
)			Phe	Pro	Cys 355	Cys	GIn	Şer	Pro	Arg 360	Thr	Thr	Gin	Ala	Thr 365	His	Pro	Cys	
				Leu 370	Lys	Gly	lle	Gly	Leu 375					• . •	•		*		
5			<210	> 3															
			(212	> 11 > DN > Ho	A	anie	ns.						:.			. •			
)			<220 <221	> > co	S			**						· ·					•
•	•		<222 <223			1110)					,							
			<400 atg Net	gcg															48
, .			cct	cta	aca	gcc	5 111	ctg	a aa	ctg	act	10 tcc	ttg	ggl	ttc	ata	15 ata	gga	96
. •			Pro																

	gic age gig gig ggc aac etc etg ate tee att tig eta gig aaa ga Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu lie Ser lie Leu Leu Val Lys As	t 144 P
	Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys	t 192
10	tca gat atc ctc aga tct gca att tgt ttc cca ttt gtg ttc aac tct Ser Asp ile Leu Arg Ser Ala lie Cys Phe Pro Phe Val Phe Asp Ser 65 70 75 80	· 2 14 - 1
15	gtc aaa aat ggc tot acc tgg act tat ggg act ctg act tgc aaa gtg Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val	
20	att gcc ttt ctg ggg gtt ttg tcc tgt ttc cac act gct ttc atg ctc lle Ala Phe Leu Gly Val Leu Ser Cys Phe His Thr Ala Phe Met Leu 100 105 110	336
	tic tgc atc agt gtc acc aga tac tta gct atc gcc cat cac cgc ttc Phe Cys lie Ser Val Thr Arg Tyr Leu Ala lie Ala His His Arg Phe 115 120 125	384
25	tat aca mag agg ctg acc ttt tgg acg tgt ctg gct gtg atc tgt atg Tyr Thr Lys Arg Leu Thr Phe Trp Thr Cys Leu Ala Val lle Cys Met 130 135 140	432
30	gig igg act cig ict gig gcc aig gca tit ccc ccg git ita gac gig Val Trp Thr Leu Ser Val Ala Met Ala Phe Pro Pro Val Leu Asp Val 145 150 155 160	480
	ggc act tac tca ttc att agg gag gaa gat caa tgc acc ttc caa cac Gly Thr Tyr Ser Phe lle Arg Glu Glu Asp Gln Cys Thr Phe Gln His 165 170 175	528
35	cgc tcc ttc agg gct aat gat tcc tta gga ttt atg ctg ctt ctt gct Arg Ser Phe Arg Ala Asn Asp Ser Leu Gly Phe Met Leu Leu Leu Ala 180 185 190	576
40	ctc atc ctc cta gcc aca cag ctt gtc tac ctc aag ctg ata ttt ttc Leu lie Leu Leu Ala Thr Gin Leu Val Tyr Leu Lys Leu lie Phe Phe 195 200 205	624
s	gtc cac gat cga aga aaa alg aag cca gtc cag ttt gta gca gca gtc Val His Asp Arg Arg Lys Het Lys Pro Val Gin Phe Val Ala Ala Val 210 220	672
	age cag aac tgg act ttt cat ggt cet gga gec agt gge cag gea get Ser Gin Asn Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gin Ala Ala 235 230 240	720
0	gcc aat tgg cta gca gga ttt gga agg ggt ccc aca cca ccc acc ttg Ala Asn Trp Leu Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Thr Leu	768

	cte	88	cato	ags	z caa	aat	gca	a aa	caco	aca	ggo	aga	aga	a a g	z cła	ttg	816
•									n The	Thr						ı Leu	
				260)				265	·			•	276)	·. ·	
5	o i c	. 11:	. 026		, , , , ,		1,,		, ,,,	353	ato	300	301	ate	. 11.	. 121	864
	Val	Leu	. Asa	Glu	Phe	Lvs	Mel	Gl	Lys	A T R	lle	Ser	Ars	Me	Phe	Tyr	
	, ,	•	275					280					285				
	•										•			. :			
10																gcc	912
	118	290		rne	Fen	rne	295		ren	irp	GIY	300		Leu	Yai	Ala	. •
								,				, 300			÷ .		
																ttt	960
4			Trp	Arg	Val			Arg	Gly	Pro	_		Pro	Gly	Gly	Phe	
15	305					310	}	,			315					320	
.* (. cta	aca	gct	gct	etc	tee	ate	aet	ttt	ecc.	CAA	PC1	222	atc	aat	cct	1008
a .						Trp											,,,,,
•					325	- .		.*		330				•	335		
20							1			- 4 -			4-4				1056
	Phe	Val	CAZ	lle	Phe	Ser	Asp	AKE	Cin Rak	Leu	Arg	Arg	Cvs	Phe	Sec	The	1056
•				340		•]		345			5	-,.	350	•••	****	
							}							-		. •	
oe .																tgt	1104
<i>25</i>	Int	rén	355	131	Lys	Arg	TAZ	360		ren	rro	Arg	365	Pro	ıyr	Cys	
			-						*								•
	_	ata	tga										, . •				1113
	Val	11e		٠.						•	:	•				•	
30		210	•			•						•					
	<210							•.									
•	<211 <212										•						
35		-) MO 3	anie	ne								•.				
	,_,,	,															
	<400					•	1							-			
	Net	Ala	Αsπ	Tyr	Ser	His	Ala	Ala	Asp		He	Leu	Gln	Asn		Ser	
·	•				5		}			10					15		
40	Pro	Leu	Thr	Ala	Phe	Leu	Lys	Leu	The	Ser	Leu	Giv	Phe	He	lle	GIV	
•				20				•	25					30			,
	··- ·				٠.			_									
•	vai	Ser		Yat	Gly	Asn	Lleu		He	Ser	He	Leu		Yal	Lys	Asp	
45			35					40				•	45				
	Lys	Thr	Lev	His	Arg	Ala	Pro	Tyr	Tyr	Phe -	Leu	Leu	Asp	Leu	Cys	Cys	
		50	٠.			-	55	-	-			60			-		
	. •	• -					1.			٠.	_						
•		ASP	118	Leu	Arg	Ser	Alla	110	Cys	Phe		Phe	Val	Phe	Asn		•
50	. 55					70					75		•			80	
	Val.	Lys	Asn	Gly	Ser	Thr	Tro	Thr	Tyr	Gly	Thr	Leu	Thr	Cys	Lys	Val	. •
		-		•	85	٠.			-	90		-		•	95		*

	· • • .		4 1			1.2	1	• • •			• •			· ·		٠,
<u>)</u> 11	e Al	a Ph	e Le 10		y Va	l Le	u Se	r Cy 10	-	e Hi	s Th	r Al	a Ph 11		t Lei	j
Ph	ie Cy	s - 11	e Se 5	r Va	l Th	r Ar	g Ty 12		lA u	a	e Al	a Hi 12		s Ar	g Phe)
Ту	r Th	r Ly	s Ar	g Lei	J Th	r Ph -13		p Th	r Cy	s Lei	1 A1:		1 11	e Cy	s Met	-
V2 14	i Tri) Th	r Le	u Se:	Va 150	1 Al:	a Nei	t Ala	a Phi	e Pro 155) Pro) Va	l Le	u As	p Val 160	
Gl	y Thi	Ty	r Sei	r Phe 165		e Ari	Glu	ı Gli	ı Asç 170	o Gin	Cys	: Th	r Pho	e G1:	n His	
Ars	r Ser	Phe	Arg 180		Asn	n Asp	Ser	Leu 185		Phe	Met	Leu	Leu 190		Ala	
Let	lle	Leu 195	Lev	Ala	Thr	Gin	Leu 200		Tyr	Lev	Lys	Leu 205		Phe	Phe	
Va I	His 210	Asp	Arg	Arg	Lys	Me t 215		Pro	Vai	Gln	Phe 220	Val	Ala	Ala	Val	
Ser 225	Gln	Asn	Trp	Thr	Phe 230		Gly	Рго	Gly	Ala 235	Ser	Gly	Gln	Ala	Ala 240	
Ala	Asn	Trp	Leu	Ala 245	Gly	Phe	Gly	Arg	Gly 250	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr 255	Leu	
Leu	Gly	lle	Arg 260	Gin	Asn	Ala	nzA	Thr 265	Thr	Gly	Arg	Arg	Arg 270	Leu	Leu	
Val	Leu	Asp 275	Glu	Phe	Lys	Met	GI u 280	Lys	Arg	He	Ser	Arg 285	Me t	Phe	Tyr	
lle	Het 290	Thr	Phe	Leu	Phe	Leu 295	Thr	Leu	Trp	Gly	Pro 300	Tyr	Leu	Val	Ala	-
Cys 305	Tyr	Trp	Arg	Yal	Phe 310	Ala	Arg	Gly	Pro	Val 315	Val.	Pro	Gly	Gly	Phe 320	
Leu	Thr	Ala	Ala	Val 325	Trp	Met	Ser	Phe	Ala 330	Gin	Ala	Gly	lle	Asn 335	Pro	
Phe	Yal	Cys	11e 340	Phe	Ser	Asn		Glu 345	Leu	Arg	Arg	Cys	Phe 350	Ser	Thr	
Thr		Leu 355	Tyr	Cys	Arg	Lys	Ser 360	Arg	Leu	Pro	,	Glu 365	Pro	Tyr	Cys	
Val	11e 370					:: :										
 1	_										-					

													-			٠.	
	(21	0> 5													•	•	
			122		•		1			•							
	\21 2			• .									•	. '	•		
-										•							
5	(21)	32 H	OMO	sapi	EU2	·											
			, ,		•		. ` '	•				- 1 - 1					
	(220															•	
• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	- <221																٠.
	<222	2> (1)	(111	9)	•							•	.* `			
	₹223				•					٠.			· .	•		· · •	
10	, ,,,,,					•				4	٠.,	2 1					
	<400	۱۱ د					•			ı							-,
	-	-		1													40
															ctg		48
	Het	Ala	YZU	inr	inr	GIY	610	Pro	GIU			26L	GIY	VIS	Leu	2ei	
	1	٠.			5				:	10	١.		•		15	•	
15			•		•											• .	
•	cca	ccg	tcc	gca	tca	gct	tat	gtg	aag	ctg	gta	ctg	ctg	gga	ctg	att	96
	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Ala	Tyr	Val	Lys	Leu	Val	Leu	Leu	Gly	Leu	Jie	
				20					25				•	30	-	1.2	1.1
•		•										•	4	•		-	
	atg	ter	ota	205	cto	ora	a a t	220	orr	ate	tto	tee	cia	cto	o to	ctc	144
20	Het																
	are t	CAZ		261	ren	MIG	413	V211	MIG	115	ren	261		reu	141	FER	
			35		•			40	•				45				
	aag																192
	Lys	Glu	Arg	Ala	Leu	His	Lys	Alz	Pro	Tyr	Tyr	Phe	Leu	Leu	Asp	Leu	•. •
<i>2</i> 5		50	٠				55					60			•		:
,			٠		•							. •					
	tgc	ctg	RCC	gat	RRC	ata	CEC	tct	gcc	gtc	tgc	ttc	CCC	ttt	gtg	ctg	240
	Cys																
	65					70			. ·		75					80	
	•••									,				,			
30	gct		- 4 -						+	356	4+-	201		-+-		4	288
																	200
en en en en en en en en en en en en en e	Ala	ser	493	ALE		GIY	251	361	ПĎ			261	VIS	reu		Lys	
•					85					90	•				95		
									_								
	aag	att	gtg	gcc	ttt	atg	gcc	gtg	ctc	ttt	tgc	ttc	cat	gcg	gcc	ttc	336
35	Lys	He	Vaj	Ala	Phe	Met	Ala	Val	Leu	Phe	Cys	Phe	His	Ala	Ala	Phe	
				100		••			105		•			110		•	
	1	•												• .			•
	atg	ctg	ttc	tgc	atc	agc	etc	acc	cgc	tac	atg	RCC	atc	RCC	cac	CEC	384
•	Met																1.00
•			115	-,-	•••	•••		120	6				125	••••	.,		
40					•					-				•			-
													 -	ac 1	~! ~		429
	cgc																432
	Arg		lyr	AIS	Lys	Arg			Leu	110	inr		Ala	Ala	A51	116	
		130					135			٠.	٠	140					
45	tgc :	atg	gcc	tgg	acc	ctg	tet	gtg	gcc	atg	gcc	ttc	cca	cct	gtc	ttt	480
	Cys (
* *	145			,		150				•	155		, •			160	
	. 70 ,					, 50											
		-4-			, A = -											444	E 9 5
	gac																528
50	Asp	Yal	Gly			r'à 2	rhe	116	Arg		Glu	qza	Gin			rne	
•					165					170					175		4 *
· ·																•	
and the second	gag	cat	cgc	tac	ttc	aag	gcc	aat	gac	acg	ctg	ggc	ttc	atg	ctt	atg	576
		-	•						-		. •			•		-	

	CI	a Ki	• Ar	o Tv	r Dh	ندا م				. TL						u Me	
				18			→ ∧1	a 73	18		, Le	u u1	7 F		90 L	EU Mê	
	ť t	g gc	t gt	g ct	c at	g gc	a gc	t ac	c ca	t gc	t gt	c ta	c gg	c az	g c	gcto	52
	Le	u Al	2 Ya 19	I Le	u Ne	t Al	a Al	a Thi 201	r Hi.	lA 2	a Va	i Ty	r G!	y Ly	s Le	u Leu	
	cti	c tt	c ga	g ta	t cg	t ca	C C91	c aas	a ti	7 221	7 002	a øt	o ra	0 at		9 553	672
	Lei	Pho 210	6 611	Ty	r Ar	g Hi	Arg 214	Ly	Me	Lys	Pro	Va 22	i Ci	n He	t Va	l Pro	
يَعَمُ الرَّالُ فِي رَحَّهُ فَيْ الرَّالُّ الْمُعَمِّلُ السَّلِيمِ الْمُعَالِّ الْمُعَالِّ الْمُعَالِّ الْمُعَالِّ الْمُعَالِّ الْمُعَالِ وَيُعَالِمُ الْمُعِمَّا الْمُعَلِّمُ السَّلِيمِ الْمُعَالِمُ السَّلِيمِ الْمُعَالِمُ الْمُعَالِمُ الْمُعَالِمُ			901			• •					-2-2-2						ور و المناف
	Ala	1 116	Ser	Gli	Ası) Ţrp	Thr	Phe	His	Gly	Pro	Gly	V Al	c ac a Th	c gg r Gi	c cag y Gin	720
	225				•	230			. 14. 		235					240	
	Ala	Ala	Ala	aac Asn	tgg Trp	ato	gcc Ala	ggc	ttt	ggc	cgt	EEE	Pro	c at	g cca	cca Pro	768
***					245					250			· · · · · ·		25		
	acc	ctg	c t g Leu	ggt	atc	CEE	Cag Gin	aat asa	ggg	cat	gca	gcc	ago	cgs	cgs	cta Leu	816
	ww. State			260	. s			,,	265		,,,,		261	270		ren	
	ctg	ZEC	aig	gac	gag	gtc	aag	ggt	SES	aag	cag	ctg	ggc	cgc	atg	itc	864
		·.,	275	nay	910	741	Lys	280	GIU	Lys	UIN	Leu	285	Arg	Met	Phe	
	tac	gcg	atc	aca	ctg	ctc	111	ctg	ctc	ctc	tgg	tca	cce	tac	atc	gtg	912
	131	A1 a 290	116	INT	Leu	Lev	Phe 295	Leu	Leu	Leu	Trp	Ser 300	Pro	Tyr	lie	Val	
	gcc	tgc	tac	tgg	cga	gig	ttt	gtg	222	gcc	tgt	gct	gtg	CCC	cac	cgc	960
	305	Cys	Tyr	Trp	Arg	7a1 310	Phe	Val	Lys	Ala	Cys 315	Ala	Vai	Pro	His	Arg 320	
	tac	ctg	gcc	act	gct	gtt	igg	atg	agc	tte	gcc	cag	gct	RCC	gtc	aac	1008
	Tyr	Leu	Ala.	Thr	A1a 325	Yal	Trp	He t	Ser	Phe 330	Ala	Gin	Ala	Ala	Va 335	Asn	
	cca	att	gtc	tgc	ttc	cte	ctc	82C	228	ምአር	etc	920	220	tor		200	1056
	Pro	lie	49)	Cys 340	Phe	Leu	Lev .	Asn.	Lys .	Asp	Leu	Lys	Lys	Cys. 350	Leu	Arg	1030
	act	rac	1	,- ·									· .				•
	Thr	ui2	Ala.	Pro	Cys	Trp	Gly '	Thr	Gly	Gly	Ala	Pro	Ala	Pro	Arg	gaa Glu	1104
			355		· ·			360					365				
	ccc Pro	Tyr (igi Cys :	gtc. Vali	atg Met	iga i						12		; ;			1122
		370			4:												
	(210)	. 6		•		٠.,			e*					; , ,			
	(211)	> 373					 4.	•							•		
	<212) <213)			7	1.7	٠,	t									*	

1			_		•						•					
		100> (1 Ali		Th	r Th	r GI	y G1	y Pro	o Gli	Gli 10		l Sei	r Gly	Ala	Leu 15	Ser
	Pr	o Pro	s Sei	A 1 a		r Ala	ı Ty	r Val	Lys 25		Val	Lei	Leu	Gly 30	Leu	He
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	Нe	t Cys	Val		Let	u Ala	Cl)	40 40		lle	Leu	Ser	Leu 45	Leu	Yal	Leu
	Ly:	s Glu 50		Ala	Lei	ı His	Lys - 55		Pro	Tyr	Tyr	Phe 60		Leu	Asp	Leu
;	Cy:	s Leu 5	Ala	Asp	GI)	7 i i e	Arg	Ser	Ala	Val	Cys 75	Phe	Pro	Phe	Val	Leu 80
	Ålå	Ser	Ÿai	Arg	Hi s 85		Ser	Ser	Trp	Thr 90	Phe	Ser	Ala	Leu	Ser 95	Cys
	Lys	ille	Val	Ala 100	Phe	Het	, Ala	Val	Leu 105		Cys	Phe	His	Ala 110	Ala	Phe
	Met	Leu	Phe 115	Cys	11e	Ser	Val	Th <i>r</i> 120		Tyr	liet	Ala	11e 125	Ala	His	His
	Arg	Phe 130	Tyr	Ala	Lys	Arg	Me t 135	Thr	Leu	Trp	Thr	Cys 140	Ala	Ála	Vai	He
	Cys 145	Met	Ala	Trp	Thr	Leu 150	Ser	Vai	Ala	Met	A12 155	Phe	Pro	Pro	Va I	Phe 160
	Asp	Val	Gly	Thr	Tyr 165	Lys	Phe	lie	Arg	Giu 170	Gļu	Asp	Gin	Cys	lle 175	Phe
	Glu	His	Arg	Tyr 180	Phe	Lys	Ala	Asn	Asp 185	Thr	Leu	Gly	Phe	We t 190	Lev	Met
	Leu	Ala	Va I 195	Leu	lie t	Ala	Ala	Thr 200		Ala	Val	Tyr	Gly 205	Lys	Leu	Leu
	Leu	Phe 210	Glu	Туг	Arg	His.	Arg 215	Lys	Met	Lys	Pro	Val 220	GIn	Me t	Val	Pro
	A1 a 225	He	Ser	GIn	Asn	Trp 230	Thr	Phe	His		Pro 235	Glý	Ala	The		GI n 240
	Ala	Ala	Ala		Trp 245	lle	Ala	Gly	Phe	Gly 250	Arg	Gly	Pro		Pro 255	
	Thr	Leu		Gly 260	ile	Arg	Gln	Asn	Gly 265	His	Ala	Ala		Arg 270	Arg	Leu
	Leu	Gly	Me t 275	Asp	Glu	Ya I	Lys	Giy 280	Glu	Lys	GIn		G1y 285	Arg	Me t	Phe
			,													

	yr Ai 29	a 0	e Thi	Leu	Lev	Phe 295	Leu	Leu	Leu	Trp	Ser 300		Tyr	lle	Val
5 3	la Cy 05	s Tyi	r Trp	Arg	Val 310	Phe	Val	Lys	Ala	Cys 315	Ala	Val	Pro	His	Arg
	yr Lei	u Ala	Thr	Ala 325	Val	Trp	Ne t	Ser	Phe 330	Ala	Gin	Ala	Ala		
10 Pi	ro IIe	. Vai	Cys 340			Leu	Asn	Lys 345			Lys	Lys	Cys 350	-335 Leu	
Th	r His	Ala 355	Pro	Cys	Тгр	Gly	Thr 360	· + 1.	Gly	Ala	Pro	Ala		Arg	Glu
15 Pr	o Tyr 370	Cys	Val	Met								303			
(2 (2	10> 7 11> 3: 12> 0:	I Va													
<22	13> Ai 20> 23> De						ial :	Seque	ence:	:For	vard	pri	ne r		
228 2007 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 2008 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908 - 1908	10> 7 lateta	ga c	gcga	tggci	, aac	gcga	gcg	a .,							31
⟨21 ⟨21	0> 8 1> 31 2> DN 3> Ar	A	: ial	Sequ	ence										
35 <22					:		a l S	eque	nce:	reve	rse	prim	er .		
	0> 8 atctag	ga gi	ctat	etee	CEE	ggcc	tcc (.	•						31
<211 <212)> 9 > 34 > dna > Art		ial :	Sequi	ence					•					
	> Des	crip	tion	of A	\rti1	ficia	ıl Se	quen	ice:F	Orwa	ırd p	rime			
\$400 2222	> 9 tctag	a tc	tatgg	gcga	acta	tago	ca t	gca		- 1					34
<210	> 10			-							*.				

	<pre><211> 35 <212> DNA <213> Artificial Sequence</pre>
5	<pre><220> <223> Description of Artificial Sequence:reverse primer</pre>
10	(400) 10 aaaatctaga aaggctaaag atttacagat getee 35
	⟨210⟩ 11
	<211> 33 <212> DNA
15	<pre><213> Artificial Sequence</pre>
	<pre><220> <223> Description of Artificial Sequence:Forward primer</pre>
	<400> 11
20	aaaatctaga gtatggccaa cactaccgga gag 33
	(210) 12 (211) 31
<i>2</i> 5	<pre><212> DNA <213> Artificial Sequence</pre>
	<pre><220> <223> Description of Artificial Sequence:reverse primer</pre>
<i>30</i>	<400> 12 aaaatctaga cctgtctgcc taccagcctg c 31
35	<210> 13 <211> 36
	<pre><212> DNA <213> Artificial Sequence</pre>
	<pre><220> <223> Description of Artificial Sequence:FLAG epitope</pre>
	<400> 13
	atggactaca aggacgacga tgacaagggg atcctg 36
	Z010\ 14
	<210> 14 <211> 12 <212> PRT
	(213) Artificial Sequence
	<220> <223> Description of Artificial Sequence:FLAG epitope
	<400> 14

	Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Gly He Leu
	나는 사용 셔츠를 가득하는데 나는 얼마는 나는 것 같아.
5	
	⟨210⟩ 15 ⟨211⟩ 32
	(212) DNA
ب فالهشار أحرار وغياد واس	(213) Artificial Sequence
10	
	(220)
أرساء الشاع في معاليات والعدادة في الأراث الماضية 	(223) Description of Artificial Sequence: Forward primer
	400 > 15
	aaaatctaga cggcgatggc gaacgctagt ga
15	
	⟨210⟩ 16
	(211) 33 (65) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1
	(212) DNA
20	<213> Artificial Sequence
	(220)
	(223) Description of Artificial Sequence: reverse primer
	⟨400⟩ 16
25	aaaatctaga cactttgaga gtcttgtgaa ggc
	⟨210⟩ 17
	(211) 33
30	(212) DNA
	<213> Artificial Sequence
	⟨220⟩
	(223) Description of Artificial Sequence:Forward primer
	<400> 17
35	aaaatctaga tctatggcga actatagcca tgc
	2010X-10
	(210) 18 (211) 35
10	⟨212⟩ DNA
	(213) Artificial Sequence
	⟨220⟩
	(223) Description of Artificial Sequence: Forward primer
5	
	<400> 18
	aaaatctaga aaggetaaag atttacagat getee 35
•	⟨210⟩ 19
	(211) 34
	<pre><212> DNA <213> Artificial Sequence</pre>
	CANADA WITH I FIRE SECRETOR AND AND AND AND AND AND AND AND AND AND

		•												,			
	•	(220)															
		(223)	Desc	ript	ion	of A	rtif	icia	1 Sei	dneu	ce:r	eve <i>r</i>	se p	rime	r		•
		• :						17;- `·								,	1
5 .		(400)								•							
		3223	ctaga	caaa	atac	tga :	actg	gccga	at c	ccc				,	r ,		34
·	•						-				· .	÷					. •
		/212								٠,				•			;
		(210) (211)				100			•			•		•			
10		(2112)										٠		•			
	•		Artii	Ficia		OHER	100		•	-					. ;		
		(210)	A			.4001		٠. ٠.						•			÷
	•	(220)	•				·										
			Descr	ioti	on o	f Ar	tifi	cial	Sec	uenc	e:re	vers	e pi	iaei		;	
15				•	-				٠.			•	•				
٠		<400>	20														
	, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	aaaat	ctaga	tgtt	ggcc	CC 8	gtat	ggtg	a to	a t						•	34
		•	٠				-	-									
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·																•
20		(210)				•	•		•				. •				
		<211> <212>	1134	٠,	٠.								٠.	•			
			Rattu	.· e en					*			•			· · ·		• * .
		(210)	NELLU	3 3Þ	•			•		-							
		〈220〉	•					٠	* *		•				*.		
<i>2</i> 5		(221)			٠.		•					•				•	
		<222>	(1)	(113	1)												
		·<223>	Rat S	REBI				•	•								
		4				٠٠.					•						
		<400>		٠.		•											
30			cg aac														48
		: 1	ia Asn	AIZ	251	610	Pro	GIA	GIY	10	ыу	GIY	GIY	AIA	15	VIS	1
					. J		•	·							13	•.	
		ECC EI	g ctg	FFC	ctc	200	cto	800	aca	ctc	agc	cte	cte	cte	tec	ete	96
			la Leu														
35				20		•			25			ŽÉ		30	•		Ĭ÷
								•						•			•, . •
	•		g gcg														144
		Ser Le	u Ala	Gly	Asn	Val	Leu		Ala	Leu	Leu	He		Arg	Giv	Arg	
40			35				•	40					.45				
40										- 4			- 4 -	A	- 4 -	,	100
		age el															192
			ev His	Arg	YIZ	Pro	1 y r 5 5	.1 7 7	Leu	Leu	LEU	43p	ren	Cys	TEN	AIZ	
•			,				33					. 00					
45		gac gg	e cie	CPC	B.C.o.	ete	Scc.	tet	cte	CCO	BC C	gtc	ato	cto	get	850	240
45		Asp GI															. 270
		. 65				70					75					80	• . • •
		_				. •				• •	; -					· ,- •	- '
		cgg cg	c gcg	gca	gcc	gcg	gcg	888	acg	cct	ccġ	ggt	gcg	ctg	ggc	tgc	288
50	•	Arg Ar															
50			•		85					90					95		
		, .									. :		•				
•	• 4	aag ci	g ctg	Bcc	ttc	ctg	gcc	gcg	ctc	ttc	tgc	ttc	cac	gcg	gcc	ttc	336
															*		

		٠		2.1						,		· .					
	Lys	s Lei	u Le	u Al	a Ph	e Le	u Al	a Al	_	_	e Cy	s Ph	e Hi	s Al	ı Al	a Phe	
		. ;		100	0				10	5				111)		
5	cts	cti	z ct	P 991	c`ef	0 00	c 01	r 2r	ר רפו	tar	Chi	7 000	e at				384
	Leu	Lei	Lei	Gi	y Va	I GI	y Va	l Th	r Ari	ZTy	Lei	Ala	a 11	e Ala	HI	s His	
			<u>ှ</u> 119	_		4 ·		12	_ :				12				
	4. 						:										
	Aro	: [[[C	TV:	l gc	ga	g Cgi	c cts	g gc	ggo	igg	CCS	tgo	gc	gcg	ati	z ctg t Leu	432
10	.AIE	130		7776		ווא ני	135			- 111	, ,,,,	140		I Als	ושמעו	ren	
الرائد المستوية المستويدة المستويدة المستويدة المستويدة المستويدة المستويدة المستويدة المستويدة المستويدة الم	ان پاکستان سا		.:	بلأنجين	در معدد مد در معدد مد	ا بسه		. 4,	· · · · · · ·	مر مقام بای	J. 24 1		إعطبا	أأرا الأماية	بأثنت	يع وأورث	
	gtg	tgo	gco	gcc	t gg	gcs	cts	gc	ttg	gcc	gcg	gcc	: ttc	: ccg	ccs	gig	480
	Va 1		Ala	Ala	Tep			ı Ala	ı Leu	Ala			Phe	Pro	Pro	Val	
15	143	• • •				150	,				155			11 :		160	
	ctg	gac	ggo	ggt	220	gcs	gac	gac	gag	gat	gce	CCE	tec	gcc	cto	gap	528
	Leu	Asp	Gly	Gly	Gly	Ala	Asp	Asp	Glu	Asp	Ala	Pro	Cys	Ala	Leu	Glu	
					165					170			r, - 2		175		
	E2 9		CCC	920	Dar	ger	cca	. aal	900	.	-	41.			ر مۇم	ctg	E76
20	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly	Ala	Pro	GIY	Ala	Leu	GIV	Phe	Leu	Leu	Len	Leu	576
				180					185					190			
			.): 													4.147	
	Ala	Ala	grg Val	. gig	GEC	gcc	acg	Cac	CTC	gic	TUP	CII	cgc	ctg	ctc	ttc Phe	624
<i>2</i> 5			195			~ "		200		***	.,,,		205	ren	Leu	F (18	
		3	•			• ;											
	ttc	atc	CSC	gac	cgc	cgc	aag	atg	cgg	CCC	gca	cgc	ctg	gtg	ccc	gcc	572
	FIIE.	210	N12	WZD	VIR	VIR	Lys 215		AFE	Pro	. A F Z	AFR 220	Lev	V21	770	Ala	1.1
	: " ,		, ·		, 4 , , , 4				. * *				· .	1.1	<u>.</u>		
30	gtc	agc	Cac	gac	tgg	acc	ttc	cac	ggc	ccg	ggc	gcc	acc	ggt	caa	gcg	720
	Va i 225	Ser	His	Asp	Trp		Phe	His	Gly			Ala	Thr	Gly	Gin	Ala	
	223					230	Sv	• • •			235	•:				240	7
	gcc	gcc	220	tgg	acg	gcg	ggc	ttc	ggc	cgc	888	CCC	acg	cca	cct	gcg	768
35	Ala	Ala	Asn	Trp	Thr	Ala	Gly	Phe	GI y	Arg	Gly	Pro	Thr	Pro	Pro	Ala	
	** .			•	245				. •	250	٠		•	٠.	255		
	ctc	gig	27£	atc	299	cct	gca	PPC	CCF	220	EFC	002	err	rpa	rer	cto	816
	Lev	Val	Gly	lle	Arg	Pro	Ala	Gly	Pro	Gly	Arg	Gly	Ala	Arg	AFR	Leu	.010
				260					265	- 5	_			270			
40	- 1 -	- 1 -															•
	c t g Leu	Rig	len	gag.	Glu	Dha	lve	acg	gag	aag	agg	ctg	tgc	aag	atg	ttc	864
			275	J. U				280	0.0	-,-	nr B	LEU	285	Lys	MEL	riie	~ .
			. *						1 3								
45	tac	gcc.	atc	acg	ctg	ctc	ttc	ctg	ctc	ctç	tgg	888	ccc	tat	gtg	gtt	912
	Tyr	Ala 290	He	ihr	Lev	Fen		Leu	Leu	Leu			Pro	Tyr	Val	Val	
		LJU	1-	: ·.,		٠٠.	295					300				: .	
	gcc :	agt	tac	ctg	CEC	glc	ctg	gtg	cgg	ccc	887	gct	gtc	CCE	Car	200	960
	Ala :	Ser	Tyr	Leu	Arg	Val	Lev	Val	Arg	Pro	Gly	Ala	Val	Pro	Gin	Ala	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •
50	305					310					315			* .	•	320	
	tar i	- 1 ~ "															1000
	tac	- 18	414	RCC	(C B	RIB	IRR	cig	463	116	RCS	cá8,	RCC	ggc	3 (C	ZZC	1008

	Ту	r Leu T	hr Ala	325		Trp	Lei	i Thi	9h (Gin	Ala	Gly	11e 335	. :	• •
5		c gtg g o Val V		Phe					Gli					Phe		1056
10		c cag t a Gin Pi						Pro					Ala			1104
		c tgc ga o Cys As 370					Gly						1 1 2			1134
15	<2°	10> 22 11> 377 12> PRT 13> Ratt	US SD		•			·:				*,·				•
20	< 40	00> 22 t Ala As I		•.	Glu	Pro	Gly	Gly	Gly 10	Gly	Gly	Gly	Ala	Glu 15	Ala	
25	Ala	a Ala Le	u Gly 20	Leu	Arg	Leu	Ala	Thr 25	Leu	Ser	Lev	Leu	Leu 30	Cys	Va!	
	Sei	r Leu Al 3	_	Asn	Val	Leu	Phe 40	Ala	Leu	Leu	lie	Va1 45	Arg	G1u	Arg	• .
30	Ser	Lev Hi 50	s Arg	Ala	Pro	Tyr 55	Tyr	Leu	Leu	Leu	Asp 60	Lev	Cys	Leu	Ala	
35	Asp 65	Gly Le	u Arg	Ala	1eu 70	Ala	Cys	Leu	Pro	Ala 75	Vai	Net	Leu	Ala	Ala 80	
~	Arg	Arg Al	a Ala	Ala 85	Ala	Ala	Gly	Thr	Pro 90	Pro	Gly	Ala	Leu	Gly 95	Cys	
40	Lys	Leu Le	Ala 100	Phe	Lev	Afa	Ala	Leu 105		Cys	Phe		Ala 110	Ala-	Phe	•
х *	Leu	Leu Lei 11!		Val	Gly	Val	Thr 120	Arg	Tyr	Leu	Ala	11e 125	Ala	His	His	
45	Arg	Phe Tyr	r Ala	Glu	_	Lev 135	Ala	Gly	Trp	Pro	Cys 140	Ala.	Ala	Met	Leu	.* _
· .	Va I 145	Cys Ala	Ala		A12 150	Leu	Ala	Lev		Al a 155	SIA	Phe	Pro		Val 160	
50	Leu	Asp Gly	Gly	Gly 165	Ala	Asp	Yżb	Glu	Asp 170	Ala	Pro	Cys	Αļa	Leu 175	Glu	
·	Gin	Arg Pro	Asp	Gly	Ala	Pro	Gly	siA	Leu	Gly	Phe	Leu	Ļeu	Leu	Leu	

					•											
			. ``	180		erik. Persana	1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 -	18	5		· ·	• •	19	10		
							4.55	* * :								
5	Ala			Val (Gly A	la Th			u Ya	l Ty	r Le			u Le	u Phe	
			195				20	U			4, 1	20	5			
	Phe	Hei	lis I	Asp A	rg A	rg Ly	s Me	t Ars	z Pro	. A1:	a Ar	e Le	u Va	i Pr	o Ala	
		210				21					22	_				
ر د المواديد بالديانية المواديد		C 1			· ¥	 L. DL								-4 -		بساند د
10	225	351 [115 /	ısb i		hr Ph 30	e ni:	s ury	rrc	23!		a in	r GI	y GI		
					_		* 15		7	,,					240	
an and same water in the property of the same of the s	Ala	Ala A	sn 1	rp T	hr A	la GI	y Phe	Gly	Arg	Gly	Pri) Th	r Pr	Pr	o Ala	23.0
				2	45	45			250					25	_	
15	Leu	Val G	ly l	le A	re Pi	ro Ala	Gly	Pro	Glv	Are		, Al:	. Are	. A-		•
			2	60			,	265	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •			, A14	270		ren .	
	1.00	V_1 1	A			er i						4				
	ren	72) L 2	eu G 75	10 G	וט פו	ne Lys	: Thr 280	GIU	Lys	Arg	Leu			Met	Phe	
20		# 1 T			٠. :						٠.	285				
	∘Tyr /	Ala I	le T	hr Le	eu Le	u Phe	Leu	Leu	Leu	Trp	Gly	Pro	Tyr	Ya!	Val	
		290				295					300			. ,	1	
	Ala	Ser T	vr L	eu Ar	è Va	l Leu	Val	Are	Pro	Clv	Ala	Va I	D.s	٥١.	41-	
	305	•		/	31	0		<u>.</u>		315	AIA	141	FIO	GIN	320	
25	.	•			· , · · · · · · · · · ·											•
	iyrι	.60 11	T A	ia Se		l Trp	Leu	Thr		A) a	Gin	Ala	Gly		Asn	
		`, : '	,						330			,		335	4. 7.	
	Pro V	'al Va	I Cy	s Ph	e Le	u Phe	Asn	Arg	Glu	Leu	Arg	Asp	Cys	Phe	Arg	
30	., 	di.	34	10	• • • • •		• • •	345					350			
	Ala G	in Ph	e Pr	o Cv	s Cy:	s Gln	Ser	Pro	Gin	Ala	The	Cin	Ala	The	Lau	
		35	5		7		360		.		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	365	, nie		Leu	
	Bro C										•	·,		٠,		
<i>35</i>	Pro C	ys as 70	D LE	O LY	S GIS	y 11e 375	GIY	Leu								•
								4.								
	/010\											•			w.,	
	〈210〉 〈211〉						· · · · ·						;			
40 .	⟨212⟩						1					d				
	〈213〉		មទីន្យ	p									•			
	〈220〉	· · ·		· · · · ·												
	〈220〉															
	〈222〉	(1)	(11	10)			• • •		. ,							
45	〈223〉	Rat	SREB	?		- 1									·:-	
	<400>	22							•							
	atg go	-	121	. 201		0.5	art			\	~	 .	· ;		,	. , .
	Met Al	a Asr	1. Ty:	Ser	His	Ala	Ala	BEC 8 Asp A	lsn I	ici He J	cig. Lépi	caz Gln	4d(Asn∃	CTC'	reg Sec	48
50	1		•	5	3				10			- • ••		15		
	cct ct Pro Le	a aca u The	gcc Al-	: Itt	ctg	222	CIG	act t	cc I	tg ;	ggt	iic:	ata:	ata	gga	96
		- 141	A I C		LEU	LY2	LEU .	int 3	er L	.כט (31 y 1	rne	116 '	ı i e	P1 A	

																	•		
												•							•
						20				•	25	•				30	,		
			gto	: ag	t gtg	gtg	gg	220	cti	tets	ato	: tcc	att	ttg	cta	gtg	aaa	gat	14
;			Val	Se	r Val	Val	Gly	Asn	Leu	Leu	110	: Ser	116	Leu	Lei	Val	Lys	Asp	
					35	;				40		• • •			45	•			
																-		.	
		٠.	zag zv l	The	s lig	Hie	Are	gc t	Pro	Tvr	Tur	. IIC Pha	len	Len	gai Aen	C T E	rgc	tgc Cys	19
0	-	•	-,-	5(• • • • •	A1 2		55		. ',			60	, not	LCu	UJS		· · ·
						,	. •					:		*				•	
•						ctc													240
+			Ser 65		lle	Leu	Arg	Ser	. Ala	He	Cys	Phe	Pro 75		Yai	Phe	Asn		
			03					10					. 13			-		80	
5		t	gtc	828	aat	ggc	tct	300	tgg	act	tac	828	act	ctg	act	tgc	aaa	gtg	288
	•		Val	Lys	Asn	Gly	Ser	Thr	Trp	Thr	Tyr	Gly	Thr	Leu	Thr	Cys	Lys	Yal	
,						•	85					90		•.			95		•.
			att	800		ctg		a † †	++0	tee	i i a t	110	-	act	acc	***	- + -		225
			lle	Ala	Phe	Leu	Gly	Val	Leu	Ser	Cys	Phe	His	Thr	Ala	Phe	Met	Leu	. 336
U						100	•	,			105					110			f
				-		•	٠.	. •	*					٠					•
		1				agc													384
			Life	Cys	115		V41	tit	VIR	120	LED	WIE	116	A I A	125	л12	Arg	Phe	
5														٠				1.0	
						agg													432
			Tyr	Thr 130		Arg	Leu	Thr		Trp	The	Cys	Leu			lle	Cys	Het	
			•	130				•	135					140					
_		• • •	gtg	tgg	act	ctg	tct	gtg	gcc	atg	gca	ttt	ccc	CC2	gtt	tta	gat	gta	480
0			Val			Leu		Val					Pro						
			145				,	150					155					160	
			886	ácc	tac	tca	110	211	200	72 0	020	gat.	rsø	tat	200	110	-43		528
						Ser													320
5		-			_		165		_			170					175		
	, .			.	44.					_						_			
٠						agg Arg													576
		•	71. 6		1116	180	nia	Vall	N2D	JEI	185	Uiy	LIIE	MC (ren	190	ren	VIE	
_											,,,						•	• •	
U			ctc	atc	ctc	cta	gcc	aca	cag	ctt	gtc	tac	ctc	aag	ctg	ata	ttt	ttt	624
			Leu	He		Leu	Ala	Thr	Gin		Val	Tyr	Léu			He	Phe	Phe	
					195					200	٠.,				205				
		-	gtc	cac	gat	cga	200	222	ate	222	ćca	gtc	CZZ	ttt	gta	RCA	gcā	ete	672
5						Arg													
	**			210	•				215					220					•
				••-	•••	.	,		•		,								
			agt															gci	720

gcc aat tgg cta gca gga ttt gga agg ggt ccc aca cca ccc acc ttg Ala Asn Trp Leu Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Thr Leu

ctg ggc atc agg cae aat gcg aat acc aca ggc aga aga cgg ctc tigg 81 Leu Gly lie Arg Glin Asn Ala Asn Thr Thr Gly Arg Arg Leu Leu 260 git lig gat gag ttc aas atg gag aas aga atc agc aga atg itc tat 86 Val Leu Asp Glu Phe Lys Mat Glu Lys Arg lie Ser Arg Met Phe Tyr 280 ata atg act ttc ctc ttc cta acc tig tsg ggt ccc tac ctg gtg gcc. 91: lie Met Thr Phe Leu Phe Leu Thr Leu Thr Gly Pro Tyr Leu Val Ala 290 295 at atg gag gtt itt gca aga ggg cct gta gta cca ggg gga ttt Cys Tyr Tip Arg Val Phe Ala Arg Gly Pro Val Val Pro Gly Gly Phe 305 305 tgc tat tsg aga gtt itt gca aga ggg cct gta gta cca ggg gga ttt Cys Tyr Tip Arg Val Phe Ala Arg Gly Pro Val Val Pro Gly Gly Phe 305 306 cta aca gcc gct gtc tsg atg agt ttc gcc caa gca gga atc aat ccc Leu Thr Ala Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Glin Ala Gly ile Asn Pro 325 tit gc tac att ttc tcc sac agg gag ctg agg cgc tgt ttc aga aca Phe Val Cys lie Phe Ser Asn Arg Glu Leu Arg Arg Cys Phe Ser Thr 340 acc ctt ctt tac tgc aga aaa tcc agg tta cca agg gaa ccl tac tgt Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Lys Ser Arg Leu Pro Arg Glu Pro Tyr Cys 355 gtt ata tga Val ile 370 C210> 24 C210> 24 C210> 24 C210> 24 C210> 24 C210> 27 C210> 24 C210> 24 C210> 24 C210> 24 C210> 24 C210> 25 S0 Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu Ile Ser Ile Leu Leu Val Lys Asp 35 Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Val Lys Asp 35 Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Val Lys Asp 35 Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Val Phe Asn Ser 50 Ser Asp Ile Leu Arg Ser Ala Ile Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser 65 Ser Asp Ile Leu Arg Ser Ala Ile Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser 65						- :	•	230		ه د ویه	233	
git itg gat gag tic aaa atg gag aaa aga atc agc ga atg itc tat 86 Val Leu Asp Glu Phe Lys Met Glu Lys Arg. He Ser Arg. Met. Phe Tyr 275 280 285 285 285 285 285 285 285 285 285 285	. 5	ctg g Leu G	gc atc a ily lie A	igg car irg Gli	aal (1' Asn /	gog aa Na As	n inr	aca g Thr (gc aga	a aga c Arg A	gg ctc i	tg 81
ata atg act tic ctc ttc cta acc ttg tgg ggt ccc tac ctg gtg gcc 91: 11e Met Thr Phe Leu Phe Leu Thr Leu Trp Gly Pro Tyr Leu Val Ala 290 295 300 15 tgc tat tgg aga git tit gca aga ggg cct gta gta cca ggg gga tit 956 Cys Tyr Trp Arg Val Phe Ala Arg Gly Pro Val Val Pro Gly Gly Phe 305 310 315 320 cta aca gcc gct gtc tga atg agt tit gcc caa gca gga atc aat ccc 100 Leu Thr Ala Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gln Ala Gly 11e Ann Pro 325 335 tit gtc tgc ati tic tcc aac agg gag ctg agg cgc tgt tic agc aca 105: Phe Val Cys 11e Phe Ser Asn Arg Glu Leu Arg Arg Cys Phe Ser Thr 340 345 350 acc cti cti tac tgc aga aaa tcc agg tta cca agg gaa cct tac tgt Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Lys Ser Arg Leu Pro Arg Glu Pro Tyr Cys 355 360 gtt ata tga Val 11e 370 (210) 24 (211) 370 (212) PRT (213) Rattus sp. (400) 24 Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn 11e Leu Gln Asn Leu Ser 1 5 10 Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe 11e 11e Gly 26 Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu 11e Ser 11e Leu Leu Val Lys Asp 35 40 Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu 11e Ser 11e Leu Leu Val Lys Asp 35 50 Ser Asp 11e Leu Arg Ser Ala 11e Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser 55 Ser Asp 11e Leu Arg Ser Ala 11e Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser 55		git i Val L		ag tto Iu Phe	aaa a Lys M	EL PIL	aaa Lys	aga a Arg l	tc ago le_Ser	aga ai	tg tto to the T	at 86 yr
290 295 300 15 tgc tat tgg aga gtt ttt gca aga ggg cct gta gta cca ggg gga ttt Gys Tyr Trp Arg Vai Phe Ala Arg Gly Pro Vai Vai Pro Gly Gly Phe 305 310 315 320 16 cta aca gcc gct gtc tgg atg agt ttc gcc caa gca gga atc aat ccc 100 Leu Thr Ala Ala Vai Trp Met Ser Phe Ala Gin Ala Gly Ile Asn Pro 325 330 335 16 ttt gtc tgc att ttc tcc sac agg gag ctg agg cgc tgt ttc agc aca 105 Phe Vai Cys Ile Phe Ser Asn Arg Glu Leu Arg Arg Cys Phe Ser Thr 340 340 345 350 20 acc ctt ctt tac tgc agg asaa tcc agg tta cca agg gaa cct tac tgt 1104 Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Lys Ser Arg Leu Pro Arg Glu Pro Tyr Cys 355 360 355 21 gtt ata tga Vai Ile 370 22 (210) 24 22 (211) 370 22 (212) PRT 22 (213) Rattus sp. 24 (204) 24 25 (210) 24 26 (211) 370 27 (212) PRT 28 (210) 24 29 (210) 24 20 (210) 25 20 (210) 26 20 (210) 27 20 (210) 27 20 (210) 28 21 (210) 29 22 (210) 30 23 (210) 24 24 (211) 370 25 (210) 24 26 (211) 370 27 (212) PRT 28 (213) Rattus sp. 29 (210) 24 20 (210) 25 30 (210) 26 20 (210) 27 20 (210) 27 20 (210) 28 210 (210) 29 220 (210) 29 230 241 Ser Vai Vai Gly Asn Leu Leu Ile Ser Ile Leu Leu Vai Lys Asp 45 25 (210) 26 26 (210) 27 27 (210) 28 28 (210) 29 29 (210) 29 20 (210) 29 20 (210) 20 20 (210) 20 20 (210) 20 210 (210) 20 211 Ser Vai Vai Gly Asn Leu Leu Ile Ser Ile Leu Leu Vai Lys Asp 45 20 (210) 20 21 (210) 21 22 (210) 23 23 (210) 24 24 (211) 370 25 (30) 30 26 (310) 315 27 (310) 335 28 (310) 335 335 335 335 335 335 335 335						280	ļ., .,.			285	in a sign	
tgc tat tgg aga get tit gca aga ggg cct gta gta cca ggg gga tit 956 Cys Tyr Trp Arg Val Phe Ala Arg Gly Pro Val Val Pro Gly Gly Phe 305 315 320 Cta aca gcc gct gtc tgg atg agt tit gcc cca gca gga atc aat ccc 100 Leu Thr Ala Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gln Ala Gly He Arro 325 tit gtc tgc att tit tc cc aac agg gag cig agg cgc tgt tit agc aca Phe Val Cys He Pee Ser Asn Arg Glu Leu Arg Arg Cys Phe Ser Thr 340 acc cit cit tac tgc aga ana tcc agg tia cca agg gaa cct tac tgt Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Lys Ser Arg Leu Pro Arg Glu Pro Tyr Cys 355 gtt ata tga Val He 370 clip Pro Callo 24 (211) 370 (212) PRT (213) Rattus sp. (400) 24 Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn He Leu Gln Asn Leu Ser 1 S 10 Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe He He Gly 25 360 Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu He Ser He Leu Cu Val Lys Asp 45 Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys 50 Ser Asp He Leu Arg Ser Ala He Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser 55				te cte he Leu	THE L	en 1111	t t g Leu	tgg g Trp G	IN Pro	tac ct Tyr Le	g gtg g u Val A	cc 91 la
325 330 335 titt gic tgc att tic toc sac agg gag cig agg cgc tgt tic agc aca Phe Vai Cys lie Phe Ser Ash Arg Glu Leu Arg Arg Cys Phe Ser Thr 340 345 345 345 345 365 365 365 365 365 365 365 365 365 36	15		t tgg ag	ga gtt g Val	Lus V	ca aga la Arg	geg Gly	rro Va	11 Val-	cca gg Pro Gl	y Gly Ph	l e - , , , ,
340 340 345 340 345 350 350 350	70	cta ac Leu Th	a gcc gc r Ala Al	4 741	tgg at Trp Me	g agt t Ser	rne A	lia Gi	a gca n Ala	gga ato Gly lle	Asn Pr	c 100 o
335 360 365 gtt ata tga Val lie 370 (210) 24 (211) 370 (212) PRT (213) Rattus sp. (400) 24 Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn lie Leu Gin Asn Leu Ser 1 5 10 15 Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Giy Phe lie lie Giy 20 25 Val Ser Val Val Giy Asn Leu Leu lie Ser lie Leu Leu Val Lys Asp 35 Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys 50 55 60 Ser Asp lie Leu Arg Ser Ala lie Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser	5	ttt gte Phe Val			tcc az Ser As	c agg n Arg	CID F	tg ag eu Ar	g cgc	Cys Phe	Ser Th	a 105/ r
Val lie 370 (210) 24 (211) 370 (212) PRT (213) Rattus sp. (400) 24 Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn lie Leu Gin Asn Leu Ser 1 5 10 15 Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Giy Phe lie lie Giy 20 25 30 Vai Ser Vai Vai Giy Asn Leu Leu lie Ser lie Leu Leu Vai Lys Asp 35 40 45 Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys 50 55 60 Ser Asp lie Leu Arg Ser Ala lie Cys Phe Pro Phe Vai Phe Asn Ser		acc ctt Thr Leu	. 250 131	tgc :	aga aa: Arg Ly:	s Ser	agg t Arg L	ta cc: eu Pro	Arg (Slu Pro	tac tgf	1104
(211) 370 (212) PRT (213) Rattus sp. (400) 24 Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn lie Leu Gin Asn Leu Ser 1 5 10 15 Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Giy Phe lie lie Giy 20 25 30 Val Ser Val Val Giy Asn Leu Leu lie Ser lie Leu Leu Val Lys Asp 35 40 45 Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys 50 55 60 Ser Asp lie Leu Arg Ser Ala lie Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser		Val lie										1113
\(\lambda 213 \rangle \) Rattus sp. \(\lambda 400 \rangle 24 \) \(\text{Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn ile Leu Gin Asn Leu Ser 1 \) \(\text{Ser Val Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Giy Phe ile lie Giy 20 \) \(\text{25} \) \(\text{30} \) \(\text{Vai Ser Val Val Giy Asn Leu Leu ile Ser lie Leu Leu Vai Lys Asp 35 \) \(\text{40} \) \(\text{Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys 50 \) \(\text{50} \) \(Ser Asp lie Leu Arg Ser Ala lie Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser 70 \)												
Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn lie Leu Gin Asn Leu Ser 1		<212> PE	RT ' '	• • •				*				
Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe ile ile Gly 20 25 30 Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu ile Ser ile Leu Leu Val Lys Asp 35 40 45 Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys 50 55 60 Ser Asp ile Leu Arg Ser Ala ile Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser		<400> 24			is Ala	Ala A	SD AS	a ile	Leu G	In Asn		
Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys 50 55 60 Ser Asp He Leu Arg Ser Ala He Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser		Pro Leu	Thr Ala 20	Phe Le	eu Lys	Leu T	hr Se		Gly Pi			
Ser Asp He Leu Arg Ser Ala He Cys. Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser		Val Ser	Val Val 35	Gly As	in Leu	Leu 40	le Sei	lle	Leu Le	u Val I IS	ys Asp	
76		Lys Thr I	Lev His	Arg Al	a Pro 55	Tyr Ty	r Phe	Leu		p Lev (ys Cys	
		Ser Asp 1 65	lle Leu	Arg Se 7	r Ala O	lie Cy	s. Phe	Pro 75	Phe Va	l Phe A		

				Val	Lys	Asn	Gly	Ser 85		Trp	Thr	Туг	Gly 90		Leu	The	Cys	Lys 95	Val
;				116	Ala	Phe	Leu 100	-	Val	Leu	Ser	Cys 105	Phe	His	Thr	Ala	Phe 110		Leu
			• . * • .	Phe	Cys	11e 115		Val	Thr	Arg	Tyr 120		Ala	lie	Ala	His 125		Arg	Phe
0				Tyr	Thr 130		Arg	Lev	Thr	Phe 135	Trp	Thr	Cys	Leu	Ala 140		He	Cys	Met
_				Va1 145		Thr	Leu	Ser	Va1 150	Ala	Het	Ala	Phe	Pro 155		Val	Leu	Asp	Val 160
5		• ;		Gly	The	Tyr	Ser	Phe 165	lle	Arg	Glu	Glu	Asp 170	Gin	Cys	Thr	Phe	GIn 175	His
0.			: s.	Arg	Ser	Phe	Arg 180	Ala	Asn	Asp	Ser	Leu 185	Gly	Phe	Met	Leu	Leu 190	Lev	Ala
				Leu	He	Leu 195	Leu	Ala	Thr	Gla	Leu 200	Yal	Tyr	Leu	Lys	Leu 205	He	Phé	Phe
5				Val	His 210	Asp	Arg	Arg	Ĺys'	Met 215	Lys	Pro	Val '	Gin	Phe 220	Val.	Aia	Ala	Va1
				Ser 225	Gin	Asn	Trp	Thr	Phe 230	His	Gly	Pro	Gly	Ala 235	Ser	Gly	GIn	Ala	Ala 240
ο		•••		Ala	Asn	Trp	Leu	Ala 245	Gly	Phe	Gly		Gly 250	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr 255	
				Leu	Gly	lle	Arg 260	Gin	Asń	Ala	Asn	Thr 265	Thr	Gly	Arg	Arg	Arg 270	Leu	Leu
5		•		Val	Leu	Asp 275	Glu	Phe	Lys	Me t	Giu 280	Lys	Arg	lle	Ser	Arg 285	Met	Phe	Tyr
	;		:	lle	He t 290	Thr	Phe	Leu	Phe	Leu 295	Thr	Leu	Trp	Gly	Pro 300	Tyr	Leu	Val	Ala
0		٠.,		Cys 305	Tyr	Тгр	Arg	Val	Phe 310	Ala	Arg	Gly		Val 315	Va I.	Pro	Gly	Gly	Phe 320
				Lev	Thr	Ala		Val 325	Trp	He t	Ser		330 A1a	Gln	Ala	Gly		Asn 335	Pro
5				Phe	Vai	Cys	11e 340	Phe	Ser	Asn		G1u 345		Arg	Arg		Phe 350	Ser	Thr
_	•			Thr	Leu	Leu 355	Tyr	Cys	Arg	Lys _,	Ser 360	Arg	Leu	Pro	Arg	G1u 365	Pro	Tyr	Cys
				Val	le 370	-						:						,	•

	210> 25 211> 112	•												
<2	12> DNA 13> Rat	r (fr. 3%)	rirus											
	20> 21> CDS													
	22> (1). 23> Rat	. (1119)												
a t	00> 25 g gcc aa t Ala As	c acc a n Thr T	cc gg hr Gi	a gag y Glu	r cce	ga:	a ga	g gti	g ag	c ggd	gea Ala	cts	tec Ser	48
15	1		5				. 10)				- 15		
Le	B cca tc	a gca t r Ala Si 20	cg gc er Ala	t tat a Tyr	gtg Val	Lys 25	Lei	g gtg	Lei	ctg Leu	gga Gly 30	ctg Leu	lie	96
20 ats Met	tgt gt Cys Va	I Ser Le	tg gca eu Ala	ggc Gly	aat Asn 40	gcc	ate He	tig Leu	tco	ctg Leu 45	ctg	gtg Val	ctc Leu	144
aag 25 Lys	gag cg Glu Arg 50	t gcc ci g Ala Le	g cac u His	22g Lys 55	gct Ala	cct Pro	tac Tyr	tac	ttt Phe	ctg Leu	ctg Leu	gac Asp	ctg Leu	192
t gc Cys 30	cta gco Leu Ala	gat gg Asp Gi	c ata y lie 70	cgc	tct Ser	gcc	atc	tgc Cys 75	t t c Phe	ccc Pro	ttt Phe	gta Val	ctg Leu 80	240
gct	tct gtg Ser Val	cgc ca Arg Hi 8	s Gly	tcc Ser	tcg Ser	tgg Trp	acc Thr 90	t t c Phe	agt Ser	gca Ala	ctc Leu	agc Ser 95	tgt Cys	288
35 aag Lys	att gtg lle Val	gcc tt Ala Ph 100	t atg e Met	gct Ala	Val	ctc Leu 105	ttt Phe	tgc Cys	ttc Phe	cat His	gcg Ala 110	gcc	t tc Phe	336
atg 40 Het	ctg ttc Leu Phe 115	Cys II	c agc e Ser	gtc Yal	acc Thr 120	cgc Arg	tac Tyr	atg Het	Ala	alc lle 125	gcc Ala	cac His	cac His	384
Arg.	ttc tat Phe Tyr 130	gcc aag Ala Ly:	g cgc s Arg	atg Het 135	aca Thr	ctc Leu	tgg Trp	aca Thr	tgc Cys 140	gca Ala	gct Ala	gtc Val	atc	432
45 tgc Cys 145	atg gcc Met Ala	tgg acc Trp Thi	ttg Leu 150	Ser	gtg Val	gcc Ala	a tg He t	gct Ala 155	ttc Phe	cca Pro	cct Pro	gtc Val	ttt Phe 160	480
50 gat Asp	gtg ggc Val Gly	acc tac Thr Tyr 165	Lys	ttt Phe	atc lie	cga Arg	g2g Glu 170	Glu	gac	cag Gln	Cys	atc lle 175	Phe	528

EP 1 067 183 A1

					,							•						5
																	atg	576
		GI) Hi	s Ar			e Lys	S Ala	a Asi			Leu	Gly	Phe	: Me1		Met	. •
5					180) .				185)				130			•
	•	ttg	g gc	t gts	gicto	: áts	gca	gc	: aca	cat	gct	gtc	tat	ggc	228	ctg	cta	624
		Let	ı Ala		_	Me 1	Ala	-A1z	Thr	His	Ala	Va I	Tyr			Leu	Leu	
			,	19	5		:		200	١.		-		205	·			
	•	cto		- 625	Tai	rot	£26	rar		ato	220	cca	oto	cao	a to	oto	ccc	672
10	Programme in the second of the											Pro						0,2
			210) , ,				215					220		•	, ,		•
_														4				
												cct Pro						720
15		225					230			,	,	235	,		• • • •	,	240	
									•	. : .		_		*		•		
												cg t Arg					CCa	768
		716	A) a		. veii	245		_ A14	, ,,,	rne	250	VIR	017	710	met	255	710	
20									•									•
																	cta	816
	•	101	LED		260		Arg	GIN	ASI	265	uiz	Ala	AIZ.	ser	270	Arg	ren	•
						•	,					• .	• • •		-			• •
25	**.											cag						854
		TEO	GIA	ME 1		Giv	72 j	Lys	280	Giv	Lys	Gin	ren	61 y 285	Arg	Wet	Phe	
	•		•						LUU					-		••		
	· ·																gtg	912
30	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	iyr	290		inr	Leu	Leu	295	Leu	Leu	Leu	Trp	Ser 300	Pro.	.lyr	lle	Val -	
30	•							233		•						:		
												tgc						960
		305	Cy \$	lyr	Trp		7a1 310	Phe	Val	Lys	VIA	Cys 315	Ala	Va!	Pro	His	Arg 320	· · ·
							310	•									220	
35												gcc						1008
		Tyr	Leu	Ala	Thr		Val	Trp	Met	Ser		Ala	Gin	Ala	Ala	Val 335	Asn	
					••	325		•			330	-				222		
	•	cca	atc	gtc	tgc	ttc	ctg	ctt	aac	aag	gàc	ctc	aag '	aag	tgc	clg	agg	1056
40		Pro	He	Yal		Phe	Lev	Leu	Yzu			Leu	Lys	Lys		Leu	Arg	•
					340		,			345					350	**.		
		act	cat	gcc	cct	tgc	tgg	ggc	aca	gga	ggt	gcc	cca	gc t.	ccc	aga	gaa	1104
				Ala					Thr			Ala	Pro	Ala				
45				355		1	٠.	i	360					365				
•		ccc	tac	tgt	otr	2 f Ø	102			, •		٠,						-1122
			Tyr	Cys				٠.	•	,							• •	
			370				•	•			. ·				٠			
50																		
		<210	> 26	;											,	•		•
.1			> 37		٠.	•		•									. • •	

EE

EP 1 067 183 A1

		2> P 3> R		oron	avir	UŠ				3						
5		0> 2 Ala		The	Thr 5	Gly	Glu	Pro	G) u	G1 u 10	Val	Ser	Gly	Ala	Leu 15	Ser
10	Leū	Pro	Ser	A l a	Ser	Ala	Tyr	Val	Lys 25		Val	Leu	Leū	Gly 30	Leu	He
سب دف	- Met	Cys	Va 1 35		Leu	Ala	Ğly	-Asn 40	Ala	-He	Leu	Ser	Leu 45	Leu	-Val	Leu
15	Lys	Glu 50	Arg	Αla	Lev	His	Lys 55	Ala	Pro	Tyr	Tyr	Phe 60	Leu	Leu	qzA	Leu
	Cys 65		Ala	Ysb	Gly	11e 70	Arg	Ser	Ala	He	Cys 75	Phe	Pro	Phe	Val	Leu 80
20	Ala	Ser	Val	Arg	His 85	Gly	Ser	Ser	Trp	Thr 90	Phe	Ser	Ala	Leu	Ser 95	Cys
	Lys	He	Val	Ala 100	,	Met	Ala	Val	Leu 105	Phe	Cys	Phe	His	Ala 110	Ala	Phe
25	Met	Leu	Phe 115	Cys	lie	Ser	Val	Thr 120	Arg	Tyr	Me t	Ala	11e 125	Ala	His	His
	Arg	Phe 130	Tyr	Ala	Lys	Arg	Met 135	Thr	Leu	Trp	Thr	Cys 140	Ala	Ala	Val	lle
30	Cys 145	Met	Ala	Trp	Thr	Leu 150	Ser	Val	Αla	Ne t	A12 155	Phe	Pro	Pro	Val	Phe 160
<i>35</i>	Asp	Val	GIŸ	Thr	Tyr 165	Lys	Phe	lle	Arg	Glu 170	Glu	Asp	Gin	Cys	11e 175	Phe
	Glv	His	Arg	Tyr 180	Phe	Lys	Ala	Asn	Asp 185	Thr	Leu	Gly	Phe	Me t 190	Leu	Met
40	Leu	Ala	Va l 195		Met	Ala	Ala	Thr 200		Ala	Val		Gly 205	Lys	Leu	Leu
	Leu	Phe 210	Glu	Tyr	Arg	His	Arg 215	Lys	Met	Lys	Pro	Va I 220	Gin	Met	Val	Pro
45	Ala 225	lie	Ser	Gin	Asn	Trp 230	Thr	Phe	His	Gly	Pro 235	Gly	SIA.	Thr	Gly	Gi n 240
	Ala	Ala	Ala		7rp 245	He	Ala	Gly	Phe	G1y 250	Arg	Gly	Pro	Het	Pro 255	Pro
50	Thr	Leu	Leu	G1y 260	lle	Arg	GIn	Asn	G1 y 265	His	Ala	Ala	Ser	Arg 270	Arg	Leu
	Leu	Gly	Met	Asp	Glu	.Va I	Lys	Gly	Glu	Lys	Gin	Lev	Gly	Arg	Me t	Phe

275

280

285

Tyr Ala lie Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Ser Pro Tyr lie Val 290 295 300

Ala Cys Tyr Trp Arg Val Phe Val Lys Ala Cys Ala Val Pro His Arg 305 310 315 320

Tyr Leu Ala Thr Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gin Ala Ala Val Asn 325 330 335

Pro 11e Val Cys Phe Leu Leu Asn Lys Asp Leu Lys Lys Cys Leu Arg 340 345 350

Thr His Ala Pro Cys Trp Gly Thr Gly Gly Ala Pro Ala Pro Arg Glu 355 360 365

Pro Tyr Cys Val Met 370

25

Claims

- 1. A G protein-coupled receptor protein which has the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4, 6, 22 or 26, or a G protein-coupled receptor protein as an equivalent to said protein.
- 2. A G protein-coupled receptor protein which has the amino acid sequence described in Sequence No. 2, 4, 6, 22 or 26
- 3. A gene which has a nucleotide sequence coding for the G protein-coupled receptor protein described in claim 1.

__

- 4. A vector which contains the gene described in claim 3.
- 5. A host cell which contains the vector described in claim 4. -
- 40 6. A method for producing the G protein-coupled receptor protein described in claim 1 or 2, or a G protein-coupled receptor protein as an equivalent to said protein, which comprises using the host cell described in claim 5.
 - 7. A method for screening a medicament acting on the G protein-coupled receptor protein described in claim 1 or 2, which comprises allowing said G protein-coupled receptor protein to contact with a compound to be tested.
 - 8. An antibody or a fragment thereof for the G protein-coupled receptor protein described in claim 1 or 2 or a partial peptide thereof.

50

45

55

FIG. 1

```
STEB 1 MANASEPGGSGGEAAALG--- ERLATUSELLCVSEAGN 36
STEB 2 MANYSHAADNILONESP--LTAFEKETSEGFIIGVSVVGN 38
STEB 3 MANTTGEPEEVSGAESEPSASAYVKEVLEGEIMCVSEAGN &
 STEB 1 V L FALL I V R ER S L H R A P Y Y L L D L C L A D G L R A L A C L P A V M 76
STEB 2 L L I S I L L V K D K T L H R A P Y Y F L L D L C L A D G L R S A I C F P F V F 78
STEB 3 A I L S L L V L K E R A L H K A P Y Y F L L D L C L A D G I R S A V C F P F V L 80
 STEB 1 LAARRAAAAA GAPPGALGCELLAFLAALFCFHAAFLILGV 115
STEB 2 NSVKNGSTUTY---GTLTCEVIAFLGVLSCFETAFHLFCI 115
STEB 3 ASVENGSSUTF---SALSCKIVAFMAVLFCFHAAFHLFCI 117
SEED 1 GVTRYLAIAHHRFYAERLAG WECAAMLVCAAWALALAAAF 156
SEED 2 SVTRYLAIAHHRFYTKRLTFWTCHAV-ICWWTLSVAWAF 154
SEED 3 SVTRYMAIAHHRFYAKRMTLWTCAAV-ICWAWTLSVAWAF 156
STEE 1 PPVLDGGG---DDEDAPCALEORPDGAPGALGFLLLLAVV 193
STEE 2 PPVLDVGTYSFIREEDQCTFQHRSFRANDSLGFHLLLALI 194
STEE 3 PPVFDVGTYXFIREEDQCIFEHRYFKANDTLGFHLMLAVL 196
SEES 1 V GATHLVYLRLLFF I HDRRKEIRPARL V PAVS HDWTFHGPG 233
SEES 2 LLATOLVYLKLIFF V HDRRKEKPVOFVAAVS ONUTFHGPG 234
SEES 3 MAATHAVYGKLLLF EYRERKERPVOM V PAIS ONUTFHGPG 236
STEE 1 ATGQAAANW TAGFGRGPTPPALVGIR PAGPGRGARRLLVL 273
STEE 2 ASGQAAANW LAGFGRGPTPPTLLGIRQNANTTGRRRLLVL 274
STEE 3 ATGOAAANW IAGFGRGPMPPTLLGIRONGHAASRR-LLGH 275
SREE 1 EEFKTEKRLCKMFYAVTLLFLLUGFYVVASYLRVLVE PG 313
SREE 2 DEFKMEKRISRMFYIMTFLFLTLUGFYLVACYWRVFARGP 314
SREE 3 DEVKGEROLGRUFYAITLLFLLUSFYIVACYURVFVKAC 315
SKEB 1 A V.P.Q.A.Y.L.T.A.S.V.W.L.T.F.A.Q.A.G.I.N.P.V.V.C.F.L.F.N.R.E.L.R.D.C.F.F.A.Q.F. 353
SKEB 2 V.V.P.G.G.F.L.T.A.A.V.W.M.S.F.A.Q.A.G.I.N.P.F.V.C.I.F.S.N.R.E.L.R.T.R.R.E.E.R.D.C.F.T.L.D.C.F.L.D.K.D.L.K.K.C.L.R.T.H.A. 355
```

376 371 374

SEEB 1 E C Q S P R T T Q A T H P - - C D L K G I G L SEEB 2 L Y C R K S - - - R L P R E P Y C - - - - - V I SEEB 3 E - C W G T G G A P A P R E P Y C - - - - - V M FIG. 2

7.5-1.4-1.4-

heart

brain

placenta

lung.

liver

skeletal muscle

kidney

pancreas

9.5-7.5-2.4-1.4-

spleen

thymus

prostate

testis

ovary

small intestine

large intestine

peripheral leukocyte

FIG. 3

amygdala

caudate nucleus

corpus callosum

hippocampus

whole brain

substania nigra

subthalamic nucleus

thalamus

cerebellum
cerebral cortex
medulla
spinal cord
occipital lobe
frontal lobe
temporal lobe
putamen

FIG. 4
7.5
1.4
1.4
1.4

heart

brain

placenta

lung

liver

skeletal muscle

kidney

pancreas

9.5-7.5-2.4-1.4-

spleen

thymus

prostate

testis

ovary

small intestine

large intestine

peripheral leukocyte

FIG. 5

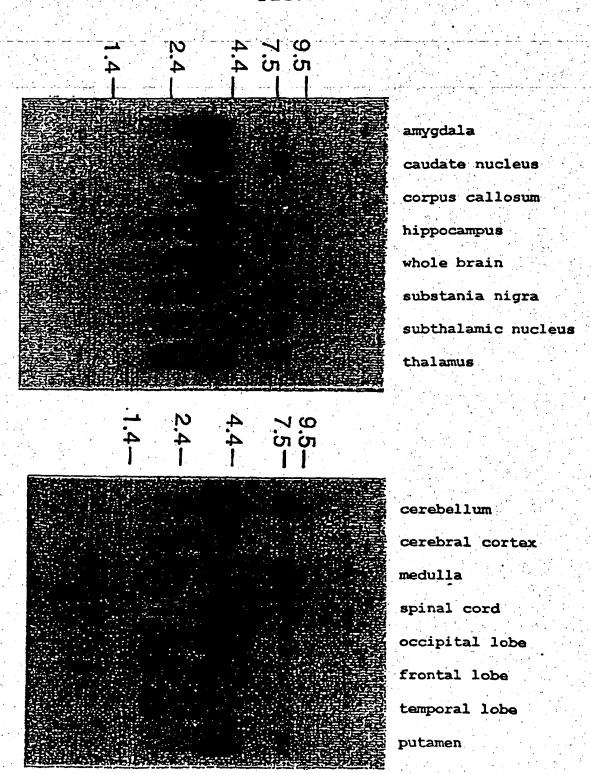
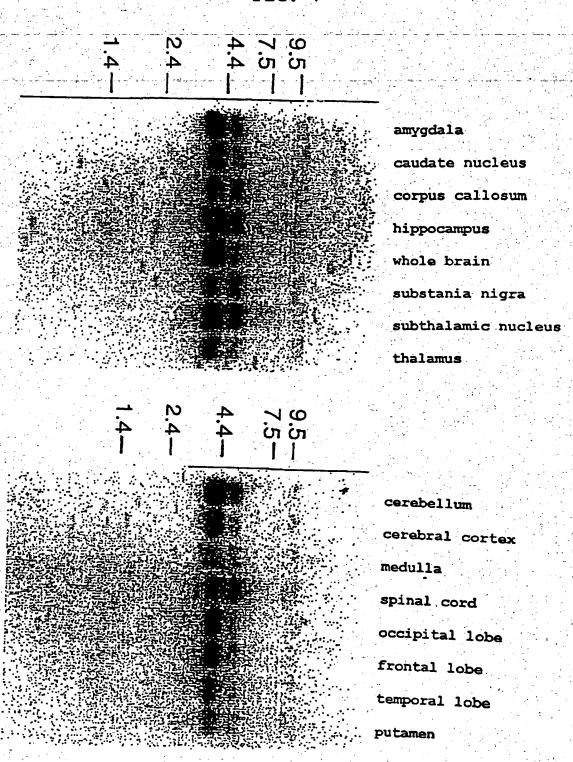
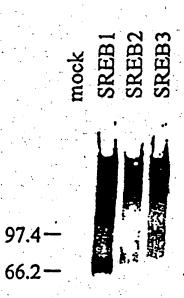


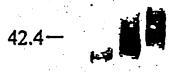
	FIG. 6	
	2. 4. 7.5. 2.4. 4. 5.1.	
4-	9.5 4.4 7.5 1.4	
j		
•	·	
		heart
9		. brain
		j. placenta
		lung
		liver
		skeletal muscle kidney
		pancreas
-1	0 4 4 9	
14-	2 4 7 9 5 1 4 4 4 4 1	
1		
		spleen
		thymus
		prostate testis
		ovary
		small intestine
		large intestine
		peripheral leukocyte

FIG. 7









30.3 —

20.1

anti-FLAG



FIG. 10

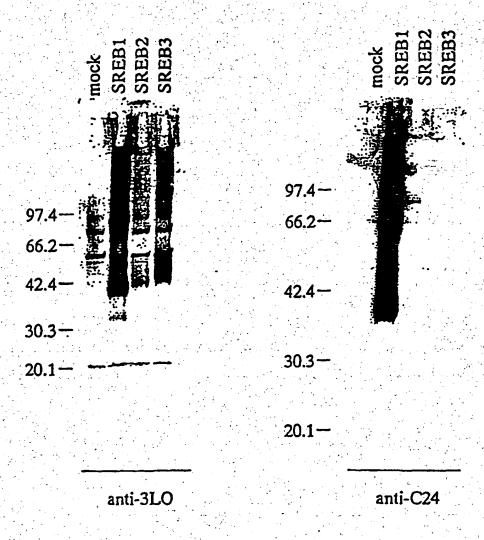


FIG. 11

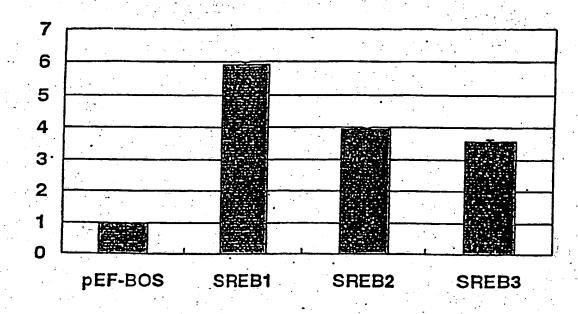
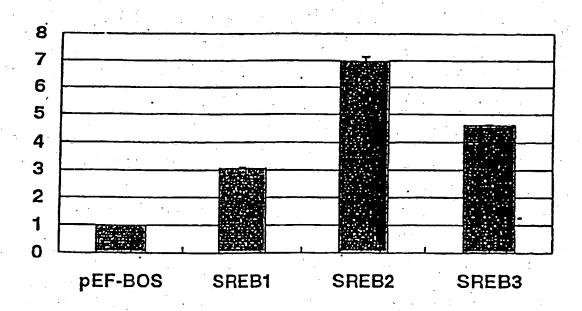


FIG. 12



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP99/0119

		PCT/JP	99701191
	IFICATION OF SUBJECT MATTER C1 C12N15/12, C07K14/705, C1	12P21/02, C07K16/28	
According to	International Patent Classification (IPC) or to both	national classification and IPC	
	S SEARCHED		
	ocumentation searched (classification system follower C1 C12N15/12, C07K14/705, C1		
Documentati	ion searched other than minimum documentation to the	he extent that such documents are include	d in the fields searched
	ata base consulted during the international search (na ank/EMBL/DDBJ/GeneSeq	me of data base and, where practicable, s	earch terms used)
2 200711	COMMON TO DE RELEVANT	A Company of the Comp	
C. DOCO	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		-
Category	Citation of document, with indication, where a	opropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US, 5508384, A (Univ. New Y 16 April, 1996 (16. 04. 96)		1-8
A	The Journal of Neruoscience Guoping Feng et al., "Clonin characterization of a novel Drosophila melanogaster" p.3	g and functional Dopamine receptor from	1-8
λ	PEBS Letters Vol. 355 No. 3 Stephen Rees et al., "Clonin of the human 5-HTsa serotonin	g and characterisation	1-8
Further	documents are listed in the continuation of Box C.	See patent family annex.	
"A" document considers carlier of "L" document cited to expecial re document means "P" document the priori	megories of cited documents: at defining the general state of the art which is not de to be of particular relevance comment but published on or after the international fiting date at which may throw doubts on priority claim(s) or which is smallish the publication date of another citation or other cason (as specified) at referring to an oral disclosure, use, exhibition or other at published prior to the international filing date but later than ty date claimed Extra completion of the international search	"T" later document published after the interr date and not in conflict with the applicat the principle or theory underlying the in document of particular relevance; the chromodered sovel or cannot be considered when the document is taken alons document of particular relevance; the chromodered to involve an inventive step to combined with one or more other such deling obvious to a person skilled in the document member of the same patent far	tion but cited to understand vention a simed invention cannot be d to involve an inventive step aimed invention cannot be when the document is locuments, such combination art mily
	in , 1999 (15. 06. 99)	22 June, 1999 (22.	06. 99)
	iling address of the ISA/ ese Patent Offic	Authorized officer Telephone No.	